

I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Schwerpunkt Endokrinologie und
Stoffwechselerkrankungen

Molekulares Schilddrüsenlabor

Prof. Dr. med. G. J. Kahaly

**„Aufbau und Validierung eines zellbasierten in vitro
Modells bei Immunthyreopathie“**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Akademischen Grades des Doktors der
Medizin

der Universitätsmedizin

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Tobias Weirauch

aus Weilburg an der Lahn

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann
1. Gutachter: Prof. Dr. med. G. J. Kahaly
2. Gutachter: Prof. Dr. med. K. Ponto

Tag der Promotion: 25.08.2023

Widmung

Für Sabine und Gunter Reuling, welche die Weitergabe und den Empfang von Wissen als eine der kostbarsten Quellen menschlichen Glücks betrachtet haben.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | xii |
| TABELLENVERZEICHNIS | xvi |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | xvii |
| | |
| 1. EINLEITUNG..... | 1 |
| 2. LITERATURDISKUSSION..... | 3 |
| 2.1. Historie - Die Namensgeber | 3 |
| 2.1.1. Robert Graves..... | 3 |
| 2.1.2. Karl Adolf von Basedow..... | 3 |
| 2.2. Anatomische Grundlagen | 4 |
| 2.2.1. Topografische Anatomie der Orbita..... | 4 |
| 2.2.2. Inhalt der Orbita | 5 |
| 2.2.2.1. Bindegewebige Strukturen | 5 |
| 2.2.2.1.1. Periorbita..... | 5 |
| 2.2.2.1.2. Corpus adiposum | 6 |
| 2.2.2.1.3. Vagina bulbi | 6 |
| 2.2.2.1.4. Bindegewebiger Aufhängapparat..... | 6 |
| 2.3. Fibroblasten..... | 7 |
| 2.4. Morbus Basedow..... | 9 |
| 2.4.1. Epidemiologie | 9 |
| 2.4.2. Genetik..... | 10 |
| 2.4.3. Endogene Faktoren | 10 |
| 2.4.4. Umweltfaktoren | 10 |
| 2.4.5. Immunpathogenese | 11 |
| 2.4.6. Diagnostik | 12 |
| 2.4.7. Behandlungsmöglichkeiten | 13 |
| 2.5. Endokrinen Orbitopathie..... | 14 |
| 2.5.1. Ätiologie | 14 |
| 2.5.2. Immunpathogenese | 15 |
| 2.5.3. Diagnostik | 17 |
| 2.5.4. Behandlungsmöglichkeiten | 19 |

| | |
|---|----|
| 2.5.4.1. Immunsuppressive Therapie..... | 19 |
| 2.5.4.2. Radiotherapie..... | 20 |
| 2.5.4.3. Orbitadekompression..... | 21 |
| 2.5.4.4. Lidchirurgie | 23 |
| 2.6. Stimulationsversuche | 24 |
| 2.6.1. Die Rolle des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) | 24 |
| 2.6.2. Vergleich wesentlicher Variablen in der cAMP-Bestimmung | 28 |
| 2.6.3. Hyaluronsäure (HA) und die humorale Immunität..... | 31 |
| 2.6.4. Vergleich wesentlicher Variablen in der HA-Bestimmung..... | 35 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 37 |
| 3.1. Material..... | 37 |
| 3.1.1. Instrumente im Zellkulturlabor (alphabetisch)..... | 37 |
| 3.1.2. Geräte im Zellkulturlabor (alphabetisch)..... | 38 |
| 3.1.3. Gewebeproben zur Zellkultivierung | 39 |
| 3.1.4. Verwendete Reagenzien (alphabetisch)..... | 39 |
| 3.1.5. Verwendete Assays und Test-Kits (alphabetisch) | 40 |
| 3.1.6. Verwendete Medien zur Zellkultur (nach Volumina) | 41 |
| 3.1.6.1. F-Medium (500 ml)..... | 41 |
| 3.1.6.2. Wachstumsmedium (500 ml)..... | 41 |
| 3.1.6.3. Einfriermedium (50 ml) | 42 |
| 3.2. Methoden | 42 |
| 3.2.1. in vitro Kultivierung orbitaler Fibroblasten..... | 42 |
| 3.2.1.1. Klassischer Weg - von der Gewebeentnahme zur Zellkultur..... | 42 |
| 3.2.1.1.1. Entnahme und Transport der Gewebeproben..... | 42 |
| 3.2.1.1.2. Zellkulturanlage..... | 42 |
| 3.2.1.1.3. Mediumwechsel | 44 |
| 3.2.1.1.4. Subkultivierung..... | 45 |
| 3.2.1.1.5. Verlauf / Fotodokumentation | 46 |
| 3.2.1.1.6. Zellzahlbestimmung | 47 |
| 3.2.1.1.7. Aussäen in 96-Well-Platte..... | 47 |
| 3.2.1.2. Alternative/Optionale Zwischenschritte | 48 |
| 3.2.1.2.1. Konservierung von Orbitagewebe bei -80°C..... | 48 |
| 3.2.1.2.2. Konservierung einer Subkultur bei -80°C..... | 49 |

| | |
|---|----|
| 3.2.1.2.3. Re-Kultivierung eingefrorener Subkulturen | 50 |
| 3.2.1.2.4. Kollagenase-Auslassversuch | 51 |
| 3.2.2. Mycoplasmentest | 51 |
| 3.2.3. MTT-Assay | 52 |
| 3.2.4. cAMP-Assay | 53 |
| 3.2.5. HA-Assay | 55 |
| 3.2.6. Melon Gel IgG Spin..... | 56 |
| 3.2.7. Auswertung | 58 |
| 3.2.8.1. Verdünnungsschema von SYD1890/4, SYD5115/2 und Org 274179-0..... | 59 |
| 3.2.8.2. Verdünnungsschema von K1-70..... | 60 |
| 4. ERGEBNISSE | 61 |
| 4.1. Fotodokumentation..... | 61 |
| 4.1.1. Wachstumsphasen orbitaler Fibroblasten in Petrischale | 61 |
| 4.1.2. Orbitale Fibroblasten in 96-Well Platte vor Assay..... | 62 |
| 4.1.3. Morphologie von Basisplatten über acht Monate | 64 |
| 4.1.4. Konfluentes Wachstum nach Kryokonservierung | 65 |
| 4.1.5. Vergleich nach Anlage der Zellkultur mit/ohne Kollagenase..... | 66 |
| 4.1.6. Morphologische Veränderungen nach Trypsin-Einwirkung | 69 |
| 4.2. Viabilitätsbestimmung mittels MTT-Assay..... | 71 |
| 4.2.1. Vergleich der Subkultivierungen 1-6..... | 71 |
| 4.2.2. Auswirkungen von Trypsin auf GOF | 72 |
| 4.2.3. GOF Stoffwechselaktivität nach Kryokonservierung..... | 73 |
| 4.2.4. Gegenüberstellung der Stoffwechselaktivität nach Serum und IgG- Reaktionspuffer Stimulation | 74 |
| 4.2.5. Auswirkungen von Inhibitoren des TSH-Rezeptors | 75 |
| 4.3. GOF Stimations- und Inhibitionsversuche im cAMP-Assay..... | 76 |
| 4.3.1. Nachweis der Stimationsfähigkeit der GOF-Zellkultur | 77 |
| 4.3.2. Vergleich der Stimationsfähigkeit von frischem und kryokonserviertem Gewebe | 80 |
| 4.3.3. Vergleich des Messzeitpunktes im cAMP-Assay | 81 |
| 4.3.4. Vergleich der Stimationszeiten im cAMP-Assay | 82 |

| | |
|---|-----|
| 4.3.5. Vergleich der Patientenseren und der daraus isolierten Immunglobuline der Klasse G | 83 |
| 4.3.6. Messung aus Überstand, Lysat und deren Kombination | 85 |
| 4.3.7. Auswirkung einer Verdünnungsreihe von M22 | 86 |
| 4.3.8. Bestimmung inhibitorischer Potentiale | 87 |
| 4.3.8.1. Inhibition mit K1-70 | 88 |
| 4.3.8.2. Inhibition mit Org 274179-0 | 89 |
| 4.3.8.3. Inhibition mit SYD1890/4 (Compound A) | 89 |
| 4.3.8.4.1. Inhibition mit SYD5115/2 (Compound D) – 1,6 ng/ml M22 | 90 |
| 4.3.8.4.2. Inhibition mit SYD5115/2 (Compound D) – 10 ng/ml M22 | 92 |
| 4.4. GOF Stimmulations- und Inhibitionsversuche im HA-Assay | 93 |
| 4.4.1. Variation von GOF-Zellzahl und Stimmulationszeit im HA-Assay | 94 |
| 4.4.1.1. Nach 48h Stimmulation mit 50 ng/ml M22 | 94 |
| 4.4.1.2. Nach 24h Stimmulation mit 10 ng/ml M22 | 96 |
| 4.4.1.3. Nach 6h Stimmulation mit 10 ng/ml M22 | 98 |
| 5. DISKUSSION | 100 |
| 5.1. Auswahl orbitaler Fibroblasten | 100 |
| 5.1.1. Verifizierung des Kultivierungsprotokolls | 100 |
| 5.1.2. Qualität der Fibroblasten im zeitlichen Verlauf | 100 |
| 5.1.3. Der Einfluss von Kollagenase auf das Zellwachstum | 101 |
| 5.1.4. Der Einfluss von Trypsin auf das Zellwachstum | 101 |
| 5.1.5. Kryokonservierung von orbitalen Fibroblasten | 102 |
| 5.1.6. Zellwachstum in 96-Well Platte | 103 |
| 5.2. Identifikation stimulatorischer Potentiale im cAMP-Assay | 104 |
| 5.3. Erprobung inhibitorischer Verdünnungsreihen im HA-Assay | 106 |
| 5.4. Vergleich unterschiedlicher Inhibitoren | 108 |
| 5.5. Inhibitoren im MTT-Assay | 109 |
| 5.6. Ausblick | 110 |

| | |
|--|-----|
| 6. ZUSAMMENFASSUNG | 112 |
| 6.1. Zusammenfassung (deutsch)..... | 112 |
| 6.2. Summary | 113 |
| 7. LITERATURVERZEICHNIS | 115 |
| 8. ANHANG | 139 |
| 8.1. Basisstimulationsversuch von M22 und Forskolin..... | 139 |
| 8.2. Viabilität GOF Patient 35 (a) und 58 (b)..... | 139 |
| 8.3. Stimulationsversuche Serum-/IgG GOF Kultur 58 | 140 |
| 8.4. Detaillierte Darstellung der Messzeiten..... | 141 |
| 8.5. Verdünnungsreihe 18,18 ng/ml bis 0,0012 ng/ml des monoklonalen TSHR-Antikörpers M22..... | 141 |
| 8.6. Effekte von verdünntem Serum..... | 142 |
| 9. LEBENSLAUF | 143 |
| 10. DANKSAGUNG..... | 145 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb. = Abbildung

Ab = Antibody

Ak = Antikörper

bspw. = beispielsweise

bTSH = bovines TSH

bzgl. = bezüglich

bzw. = beziehungsweise

ca. = circa

cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat

CAS = case activity score

C = Celcius

CHO = chinese hamster ovary

CCL2 = CC-Chemokin-Ligand-2

CO₂ = Kohlendioxid

d = day/days

deut. = deutsch

DMEM = Dulbecco's Modified Eagles Medium

DMSO = Dimethylsulfoxid

DNA = Desoxyribonukleinsäure

DON = Dysthyreote Optikusneuropathie

EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure

EGF = Epidermal Growth Factor

ELISA = Enzyme - linked Immunosorbent Assay

engl. = englisch

EO = Endokrine Orbitopathie

EUGOGO = European Group On Graves' Orbitopathy

et al. = et alii, et aliae, et alia

FBS = Fetales Bovines Serum

fT3 = freies Trijodthyronin

fT4 = freies Thyroxin

g = Gramm

GAG = Glykosaminoglykane

GD = Graves' Disease

GD-IgG = Graves' Disease Immunglobuline

GOF = Graves' orbital fibroblasts
ggf. = gegebenenfalls
Gy = Gray
h = hour/hours
HA = Hyaluronic Acid
HAS = Hyaluronan synthase
H₂SO₄ = Schwefelsäure
i.d.R. = in der Regel
Ig = Immunglobulin
IgE = Immunglobuline der Klasse E
IgG = Immunglobuline der Klasse G
IGF-1 = Insulin like growth Factor - 1
IGF-1R = Insulin-like growth Factor - 1 Rezeptor
IL = Interleukin
i.v. = intravenös
l = Liter
LMW = Low Molecular Weight
log = Logarithmus
M. = Muskelus oder Morbus
M22 = humaner monoklonaler Antikörper des TSHR
MAk = Monoklonaler Antikörper
max. = Maximum
MC4 = Melanocortin 4
mg = Milligramm
min. = Minimum
Mm. = Muskuli
mm = Millimeter
mMol = Millimol
ml = Milliliter
mol/l = Mol pro Liter
mRNA = Boten-Ribonukleinsäure
MTT = 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
mU = Milliunit
N. = Nervus
n = Fallzahl/Anzahl der Proben

NaOH = Natriumhydroxid
ng = Nanogramm
nMol = Nanomol
Nr. = Nummer
ns = nicht signifikant
nU = Nanounit
OP = Operation
P = Passage
p = ermittelter p-Wert
Pat. = Patient/in
pAKT = phosphatidylinositol 3-kinase Pathway
PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF = Platelet-derived growth factor
pERK = protein kinase R-like ER kinase Pathway
PGE = Prostaglandin-E
pMol = Picomol
RER = Raues endoplasmatisches Retikulum
rhTSH = recombinant human thyroid-stimulating hormone
RLK = Receptor-Like-Kinase
rpm = revolutions per minute
S = Subkultivierung
sec = Sekunde/n
sog. = sogenannt/e/en/er
SOP = Standard Operating Procedure
Tab. = Tabelle
TBI = Thyroidea-inhibierende-Autoantikörper
TBS = Tris Buffered Saline
Tg = Thyreoglobulin
TGF = Transforming Growth Factor
TMB = Tetramethylbenzidine
TPO = thyreoidale Peroxidase
TSH = Thyreotropin/Thyroidea-stimulierendes Hormon
TRAK = Thyreotropin-Rezeptor-Autoantikörper
TSAbs = Graves' Disease TSHR-Stimulating Antibodies
TSI = Thyroidea-stimulierende-Antikörper

TSHR = thyroid-stimulating hormone receptor

U/l = Units pro Liter

u.a. = unter anderem

USA = United States of America

v.a. = vor allem

z.B. = zum Beispiel

μg = Mikrogramm

μl = Mikroliter

μm = Mikrometer

μMol = Mikromol

\bar{x} = Mittelwert

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Vergleich wesentlicher Variablen in der Durchführung der cAMP-Messung

Tab. 2: Vergleich wesentlicher Variablen in der Durchführung der HA-Messung

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Überblick orbitaler Strukturen (Kels, Grzybowski and Grant-Kels, 2015)

Abb. 2: Schematische Darstellung eines Fibroblasten

Abb. 3: Interaktionsmodell zwischen orbitalen Fibroblasten und des Autoimmunprozess

Abb. 4: Die Rolle des TSH- und IGF-1-Rezeptors in der Immunpathogenese der Endokrinen Orbitopathie

Abb. 5: Evidenzbasiertes, interdisziplinäres Management der endokrinen Orbitopathie

Abb. 6a: Chemische Struktur von Org 274179-0

Abb. 6b: Chemische Struktur von SYD5115/2

Abb. 7: Schemata der Passagierung von GOF

Abb. 8a: Verdünnungsschema zur Vorbereitung von SYD1890/4, SYD5115/2 und Org 274179-0

Abb. 8b: Verdünnungsschema von K1-70

Abb. 9a und b: GOF Patient 104 nach 7d Inkubation

Abb. 10a und b: GOF Patient 104 nach 21d Inkubation

Abb. 11a und b: GOF Patient 104 nach 30d Inkubation

Abb. 12a und b: GOF Patient 28, 4. Tag in Passage 3

Abb. 13a und b: GOF Patient 104, 4. Tag in Passage 3

Abb. 14a und b: GOF Patient 35 und 58 (gepoolt), 4. Tag in Passage 3

Abb. 15a: GOF Patient 58 nach 40d zum ersten Mal konfluent in Basisplatte

Abb. 15b: GOF Patient 58 nach 72d zum ersten Mal konfluent in Basisplatte

Abb. 15c: GOF Patient 58 nach 109d zum ersten Mal konfluent in Basisplatte

Abb. 15d: GOF Patient 58 nach 148d zum ersten Mal konfluent in Basisplatte

Abb. 15e: GOF Patient 58 nach 193d zum ersten Mal konfluent in Basisplatte

Abb. 15f: GOF Patient 58 nach 241d zum ersten Mal konfluent in Basisplatte

Abb. 16a: GOF Patient 35 rekultiviert nach sechs Monaten Kryokonservation

Abb. 16b: GOF Patient 35 rekultiviert nach 12 Monaten Kryokonservation

Abb. 17a: GOF Patient 58 rekultiviert nach sechs Monaten Kryokonservation

Abb. 17b: GOF Patient 58 rekultiviert nach 12 Monaten Kryokonservation

Abb. 18a: GOF Patient 72 rekultiviert nach sechs Monaten Kryokonservation

Abb. 18b: GOF Patient 72 rekultiviert nach 12 Monaten Kryokonservation

Abb. 19a: GOF Patient 79, Anlage mit Kollagenase

Abb. 19b: GOF Patient 79, Anlage ohne Kollagenase
Abb. 20a: GOF Patient 85, Anlage mit Kollagenase
Abb. 20b: GOF Patient 85, Anlage ohne Kollagenase
Abb. 21a: GOF Patient 86, Anlage mit Kollagenase
Abb. 21b: GOF Patient 86, Anlage ohne Kollagenase
Abb. 22: Gegenüberstellung der Anzahl der GOF nach 30 Tagen mittels zweier Anlagemethoden (Kollagenase/ohne Kollagenase).
Abb. 23a-d: GOF Patient 35/58 (gepoolt), 4. Tag in Passage 3, Einwirkung von Trypsin
Abb. 24a und b: GOF Patient 35/58 (gepoolt), 7. Tag in Passage 4, nach 30 Minuten Trypsinierung
Abb. 25: Stoffwechselaktivität der Subkulturen 1-6 von Patient 35 und 58
Abb. 26: Stoffwechselaktivität der GOF nach Inkubation mit Trypsin
Abb. 27: Stoffwechselaktivität der GOF nach sechs, neun und 12 Monaten Kryokonservierung
Abb. 28: Stoffwechselaktivität nach GOF Inkubation in Serum vs IgG-Reaktionspuffer
Abb. 29: Viabilität Patient 35 + 58 kumulativ unter Inkubation mit Inhibitoren
Abb. 30: Exemplarische Standardkurve des cAMP-Assays
Abb. 31: Basisstimulationsversuch von M22 und Forskolin
Abb. 32a-d: Stimulationsversuche Serum-/IgG GOF Kultur 35
Abb. 33a: Effekt von verdünntem Serum
Abb. 34: Vergleich der Stimulationsfähigkeit von frischem kryokonservierten Gewebe
Abb. 35: Vergleich Messzeiten im cAMP-Assay
Abb. 36: Vergleich Stimulationszeiten im cAMP-Assay
Abb. 37: Vergleich der Stimulationspotentiale von Seren mit unterschiedlichen Gesamt-IgG-Konzentrationen
Abb. 38: Vergleich der Stimulation von Immunglobulinen unterschiedlicher Spender
Abb. 39: Vergleich der Messungen in Überstand, Lysat und der Kombination aus Überstand und Lysat
Abb. 40: Verdünnungsreihe 4000 ng/ml bis 0,02 ng/ml des monoklonalen TSHR-Antikörpers M22
Abb. 41: Verdünnungsreihe K1-70 im cAMP-Assay
Abb. 42: Verdünnungsreihe Org 274179-0 im cAMP-Assay
Abb. 43: Verdünnungsreihe SYD1890/4 im cAMP-Assay

Abb. 44: Verdünnungsreihe SYD5115/2 in Zellen der 3. Passage im cAMP-Assay

Abb. 45: Verdünnungsreihe SYD5115/2 in Zellen der 1. Passage im cAMP-Assay (1,6 ng/ml M22)

Abb. 46: Verdünnungsreihe SYD5115/2 in Zellen der 1. Passage im cAMP-Assay (10 ng/ml M22)

Abb. 47: Inhibitionsversuch SYD5115/2 im HA-Assay mit 10.000 Zellen und 48h M22 Inkubation

Abb. 48: Inhibitionsversuch Org 274179-0 im HA-Assay mit 10.000 Zellen und 48h M22 Inkubation

Abb. 49: Inhibitionsversuch K1-70 im HA-Assay mit 10.000 Zellen und 48h M22 Inkubation

Abb. 50: Inhibitionsversuch SYD5115/2 im HA-Assay mit 7000 Zellen und 24h M22 Inkubation

Abb. 51: Inhibitionsversuch Org 274179-0 im HA-Assay mit 7000 Zellen und 24h M22 Inkubation

Abb. 52: Inhibitionsversuch K1-70 im HA-Assay mit 7000 Zellen und 24h M22 Inkubation

Abb. 53: Inhibitionsversuch SYD5115/2 im HA-Assay mit 7000 Zellen und 6h M22 Inkubation

Abb. 54: Inhibitionsversuch Org 274179-0 im HA-Assay mit 7000 Zellen und 6h M22 Inkubation

Abb. 55a und b: Basisstimulationsversuch von M22 und Forskolin in GOF Kultur 35 (a) und 58 (b)

Abb. 56a und b: Viabilität GOF Patient 35 (a) und 58 (b)

Abb. 57a-h: Detaillierte Darstellung Stimulationsversuche Serum-/IgG GOF Kultur 35 und 58

Abb. 58: Detaillierte Darstellung der verschiedenen Messzeitpunkte

Abb. 59: Verdünnungsreihe 18,18 ng/ml bis 0,0012 ng/ml des monoklonalen TSHR-Antikörpers M22

Abb. 60: Detaillierte Darstellung der Effekte von verdünntem Serum

1. Einleitung

Der Morbus Basedow (engl. Graves' disease, GD) ist eine organspezifische Autoimmunerkrankung, welche zur Überproduktion von Schilddrüsenhormonen (sog. Hyperthyroidismus) führt. Er stellt neben der funktionellen Schilddrüsenautonomie die klinisch wichtigste Form der Hyperthyreose dar. Eine Inzidenz von 20/100.000 Einwohnern pro Jahr (westliche Welt) unterstreicht hierbei seine Bedeutung (Antonelli et al., 2015; Smith and Hegedüs, 2016). Neben einer vielfältigen und variablen Allgemeinsymptomatik charakterisiert die Autoimmunerkrankung häufig die Struma, der Hyperthyroidismus und in 25% der Patient*innen die Endokrine Orbitopathie, welche im Zentrum dieser Arbeit steht (Bartalena, 2013).

In den letzten Jahrzehnten konnte ein enormer Wissenszuwachs bzgl. der Pathophysiologie der Endokrinen Orbitopathie generiert werden. Das zugrunde liegende autoimmune Ungleichgewicht oder die Akkumulation von Glykosaminoglykanen (GAG) und des Kollagens sind an dieser Stelle stellvertretend zu nennen (Weetman, 1991; Smith, Bahn and Gorman, 1989). Jedoch stehen weiterhin entscheidende Fragen zur Diskussion. Von Interesse sind u.a. die genauen pathophysiologischen Abläufe nach Bindung von rekombinanten humanen Thyroidea-stimulierendem Hormon (rhTSH) oder TSH-Rezeptor-stimulierender Graves' disease Immunglobulinen“ (GD-IgGs) am TSH-Rezeptor, welche von differenzierten orbitalen Fibroblasten exprimiert werden. Über die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) wird hier mutmaßlich die Synthese von Hyaluronsäure (HA) erhöht (van Zeijl et al., 2011).

Grundlage dieser Arbeit stellt die umfangreiche in vitro Kultivierung orbitaler Fibroblasten in einer Zellkultur dar. Diese wird anhand zahlreicher mikroskopischer Aufnahmen verschiedener Vergrößerungen dokumentiert. Im Rahmen der Kultivierung werden Stimulationsversuche mit spezifischen sowie unspezifischen Antikörpern, Patient*innen-Seren und aus den Seren isolierte IgG-Antikörper durchgeführt. Diverse Variablen, wie z.B. die Anzahl der Zellen pro Well, die Stimulationszeit, die Konzentration der eingesetzten Antikörper oder auch der Zeitpunkt der Messung etc. werden durch den Erkenntnisgewinn wiederholter Assays optimiert.

Neben Bioassays zum Nachweis Thyroidea-stimulierender- (TSI) und Thyroidea-blockierender- (TBI) TSH-Rezeptor Antikörper, welche mit einer chimerischen Zelllinie aus Chinesischen-Hamster-Ovariazellen (CHO-Zellen) durchgeführt

werden, rücken die humanen orbitalen Fibroblasten zunehmend in den Fokus der experimentellen Erprobung neuer Wirkstoffe. Humane orbitale Fibroblasten sind die Zielzellen der autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen in der Orbita und bieten ein realitätsnahes Modell, da sie den TSH-Rezeptor exprimieren (Neumann et al., 2012). Substanzen, welche vielversprechende Ergebnisse im Bioassay zeigen, sollen in diesem Modell einer weiteren wichtigen *in vitro* Verifizierung unterzogen werden.

Ziel dieser Arbeit war es ein geeignetes Protokoll für Stimulations- bzw. Inhibitionsversuche orbitaler Fibroblasten zu erarbeiten, um somit eine Grundlage zur Etablierung eines verlässlichen *in vitro* Test-Kits zur Aktivitätsbestimmung der Endokrinen Orbitopathie bereitzustellen.

2. Literaturdiskussion

2.1. Historie - die Namensgeber

2.1.1. Robert James Graves (McKenna, 2001)

Robert James Graves wurde 1796 in Dublin geboren. Er studierte Medizin am dortigen Trinity College, Dublin. Nachdem er sein Studium 1818 abschließen konnte, zog es ihn durch Europa. Neben London und Kopenhagen besuchte er mit Göttingen und Berlin auch deutsche Städte, wo ihn vor allem die Lehrmethoden beeindruckten.

1821 kehrte Graves nach Dublin zurück und arbeitete dort am Meath Hospital, wo er als Arzt und Lehrer auf sich aufmerksam machte. Er etablierte u.a. das Bed-Side Teaching. Der Schwerpunkt seiner Lehrveranstaltungen lag auf der detaillierten Untersuchung von weit verbreiteten chronischen Erkrankungen. Seine klinischen Interessen lagen insbesondere auf Infektionserkrankungen und Fieber, weshalb er auch bei einem Typhusausbruch in West-Irland einer Gruppe von Ärzten vorstand.

Graves war 1824 Mitbegründer der Park Street School of Medicine. Er machte zahlreiche Originalbeobachtungen und war vermutlich der erste Mediziner, der das Angioneurotische Ödem beschrieb und die Charakterisierung des Morbus Raynaud vornahm. 1843 veröffentlichte er ein großes Lehrbuch „A system of clinical medicine“, welches später in viele Sprachen übersetzt wurde. Als Professor des „Institute of Medicine“ des Trinity College wirkte er bis 1841, ehe er Präsident des Royal College of Physicians of Ireland wurde.

Die brillante Karriere des Robert Graves fällt in das goldene Zeitalter der Irischen Medizin. Eine Ära, die durch Stokes, Adams, Cheyne, Sir William Wilde und vielen weiteren geprägt wurde. Seine medizinischen Publikationen genossen zur damaligen Zeit höchstes Ansehen. Eines dieser Paper „*Newly observed affection of the thyroid gland in females*“, wurde im London Medical and Surgical Journal 1853 publiziert. Darin beschrieb er die klinischen Merkmale, die uns heute als M. Basedow (engl. Graves' Disease) bekannt sind.

2.1.2. Karl Adolf von Basedow (Norpoth, 1953)

Karl Adolph von Basedow wurde 1799 in Dessau geboren. Nach dem Abitur studierte er Medizin in Halle und Paris, anschließend promovierte er 1821 in Halle zum Doktor

der Medizin und Chirurgie. Daraufhin zog es ihn nach Merseburg. Karl Adolf von Basedow war auch Amtsarzt und medizinischer Schriftsteller.

Während der schweren Cholera-Epidemie 1830/1831 erforschte er in Magdeburg die tödliche Durchfallerkrankung. Bei Infektionskrankheiten bediente er sich der „Kranken-Meldezettel“ zur schnellen Ermittlung von Erkrankungsfällen. Außerdem beschrieb er den Tripper-Rheumatismus. Da von Basedow 1854 wenige Tage nach einer durchgeführten Obduktion in Merseburg starb, wird bis heute eine Infektion infolge der Leichenöffnung diskutiert.

Im deutschsprachigen Raum kennt man seinen Namen vor allem durch die Erkrankungsbezeichnung Morbus Basedow. Dieser geht mit denen von ihm beschriebenen Merseburger Trias einher, welche sich aus Struma, Tachykardie und Endokriner Orbitopathie zusammensetzen. Die Pionierleistung wurde unter anderem auch durch die Erkennung der Bedeutung von Jod charakterisiert. Er beschrieb die Erkrankung bereits 1840, doch den Ruhm der Erstbeschreibung wird ihm u.a. von G. Flajani (1741-1808) und R. J. Graves (1797-1853) streitig gemacht.

2.2. Anatomische Grundlagen

2.2.1 Topografische Anatomie der Orbita

Die Orbita stellt die Grundlage für die Halterung und Lagerung des Bulbus oculi dar. In ihr, in einem kleinen knöchern begrenzten Raum, befinden sich die Weichteile des Sehapparats. Sie ist auch Durchgangsstraße für einige Leitungsbahnen der Gesichtsregion, fünf Hirnnerven und zahlreiche Gefäße, weshalb bei Orbitaerkrankungen und bei chirurgischen Eingriffen nicht unerhebliche Komplikationen (Erblindung, Verlust des Auges) auftreten können. Lokalisiert ist die Orbita unterhalb der vorderen Schädelgrube (Fossa cranii anterior). Sie besitzt die Form einer vierseitigen Pyramide. Ihr vertikaler Durchmesser beträgt lediglich 35mm, wohingegen der horizontale Durchmesser 40 mm beträgt. Das Volumen wird in der Literatur mit 30 ml umschrieben (Welkoborsky et al., 2016). Zahlreiche Foramina dienen dem Durchtritt von Leitungsbahnen. Lagebedingt weist die Orbita topografische Beziehungen zu vielen Gesichtsregionen auf. So bildet das Orbitadach die vordere Schädelgrube und über den Canalis opticus bzw. die Fissura orbitalis superior besteht Kontakt zur mittleren Schädelgrube. Darüber hinaus besteht über die Fissura orbitalis inferior auch Kontakt zur Fossa pterygopalatina und zur Fossa infratemporalis. Das

Dach, der Boden und die mediale Wand trennen die Orbita durch zum Teil sehr dünne Wände von den Nasennebenhöhlen (unten medial: Sinus maxillaris, oben vorn: Sinus frontalis, medial: Cellulae ethmoidales).

2.2.2. Inhalt der Orbita

Die Orbita lässt sich durch das Septum orbitale, welches am Orbitaeingang lokalisiert ist, in den präseptal gelegenen Schutzapparat des Auges und den postseptal gelegenen Orbitainhalt, welcher von einer Bindegewebshülle (Periorbita) umgeben ist, gliedern. Dem Orbitainhalt werden Fettkörper, Bulbus oculi, äußere Augenmuskeln, Glandula lacrimalis und zahlreiche Leitungsbahnen zugeschrieben. Da äußere Augenmuskeln und Bulbus oculi einen pyramidenförmigen Muskelkegel (Konus) bilden, wird eine weitere Gliederung des postseptalen Raums vorgenommen. Man unterscheidet hier zwischen oberer, mittlerer und unterer Etage.

2.2.2.1. Bindegewebige Strukturen

Da die orbitalen Fettgewebsresektionen eine Grundlage dieser Arbeit darstellten, wird hier besonderer Fokus auf die wichtigsten Strukturen genommen.

2.2.2.1.1. Periorbita

Die Periorbita ist eine straffe, trichterförmige, leicht ablösbare bindegewebige Hülle, welche den postseptalen Raum der inneren Augenhöhle auskleidet, der sich hinter dem Septum orbitale befindet. Vorne seitlich geht sie in das Septum orbitale über und bildet darüber hinaus auch den Sehnenring für die meisten äußeren Augenmuskeln. Die gut vaskularisierte Periorbita ist mit der Durascheide des Nervus opticus verwachsen und wird durch Äste des Nervus trigeminus sensibel versorgt. In ihrer Funktion schützt sie den Orbitainhalt vor Infektionen und periostalen Blutungen. Eine Tumorausbreitung kann außerdem durch sie begrenzt werden. Vor allem im Bereich der Fissura orbitalis inferior enthält die Periorbita glatte Muskelzellen, welche man in ihrer Gesamtheit als Muskulus orbitalis (deut.: Müller-Muskel) bezeichnet. Von klinischer Bedeutung ist an dieser Stelle das Horner-Syndrom zu nennen. Durch eine Blockade des Ganglion stellatum kommt es zum Ausfall der sympathisch innervierten glatten Muskeln, wie z.B. den Muskulus orbitalis der Periorbita. Klinisch imponiert ein

Enophthalmus. Die weiteren Symptome des Horner-Syndroms sind eine Ptosis (Mm. tarsales) und Miosis (M. dilatator pupillae).

2.2.2.1.2. Corpus adiposum

Da der Bulbus oculi und die ihm angrenzenden äußeren Augenmuskeln die Orbita nicht ganz ausfüllen, werden sie von einem Fettkörper, dem Corpus adiposum umgeben. Dieser Fettkörper reicht bis zur Periorbita und dient vor allem als elastisches Polster zur Stützung des Bulbus und als Widerlager bei seinen Bewegungen. In seinen vorderen Anteilen enthält er vor allem Bindegewebe, wohingegen er in seinen hinteren Anteilen aus großen Fettlappen besteht. Das Septum orbitale verhindert am Aditus orbitalis ein Austreten von Fettgewebe.

2.2.2.1.3. Vagina bulbi

Die Tenon-Kapsel, zumeist als Vagina bulbi benannt, ist eine faszienartige Bindegewebsverdichtung. Sie grenzt den Bulbus oculi vom periorbitalen Fettgewebe ab und lässt sich in ein inneres und äußeres Blatt unterteilen. Man unterscheidet auch eine obere frontal stehende, von einer unteren horizontal liegenden Bindegewebsplatte, über welche sie an der Periorbita befestigt ist. Funktionell kann sie mit einer Sehnenscheide verglichen werden, da sie bei lokaler Dehnung und Stauchung kleinere Bewegungen zwischen Bulbus und Vagina bulbi ermöglicht.

2.2.2.1.4. Bindegewebiger Aufhängapparat

Bindegewebsmanschetten fixieren die Endabschnitte aller extraokulären Augenmuskeln an der Periorbita. Man unterteilt die Muskelbäuche in einen inneren und äußeren Teil. Die Muskelfasern des äußeren Stratum orbitale enden über sehnige Verbindungen in der Periorbita, wohingegen das innere Stratum bulbare über die jeweilige Endsehne an der Sklera des Bulbus befestigt ist. Im vorderen Bereich des Muskulus rectus medialis und des Muskulus rectus lateralis zeigen sich besonders prominente Verbindungen mit der Orbitawand, welche man als mediale und laterale Hemmbänder (Check-Ligamente) bezeichnet. Dazu gesellt sich ein weiteres Check-Ligament, das sog. Whitnall-Ligament, welches transversal verläuft und den M. levator palpebrae superioris umgibt und das Anheben des Oberlids limitiert. Auch die Faszien des Muskulus rectus inferior und des Muskulus obliquus inferior sind über

bindegewebige Hemmbänder mit der Periorbita verbunden. In seiner Gesamtheit sorgt der beschriebene Bandapparat für eine stabile Lagerung und ein Gleichgewicht des Bulbus. Reißen Bänder bspw. bei Schädeltraumata ein, kann ein Strabismus resultieren.

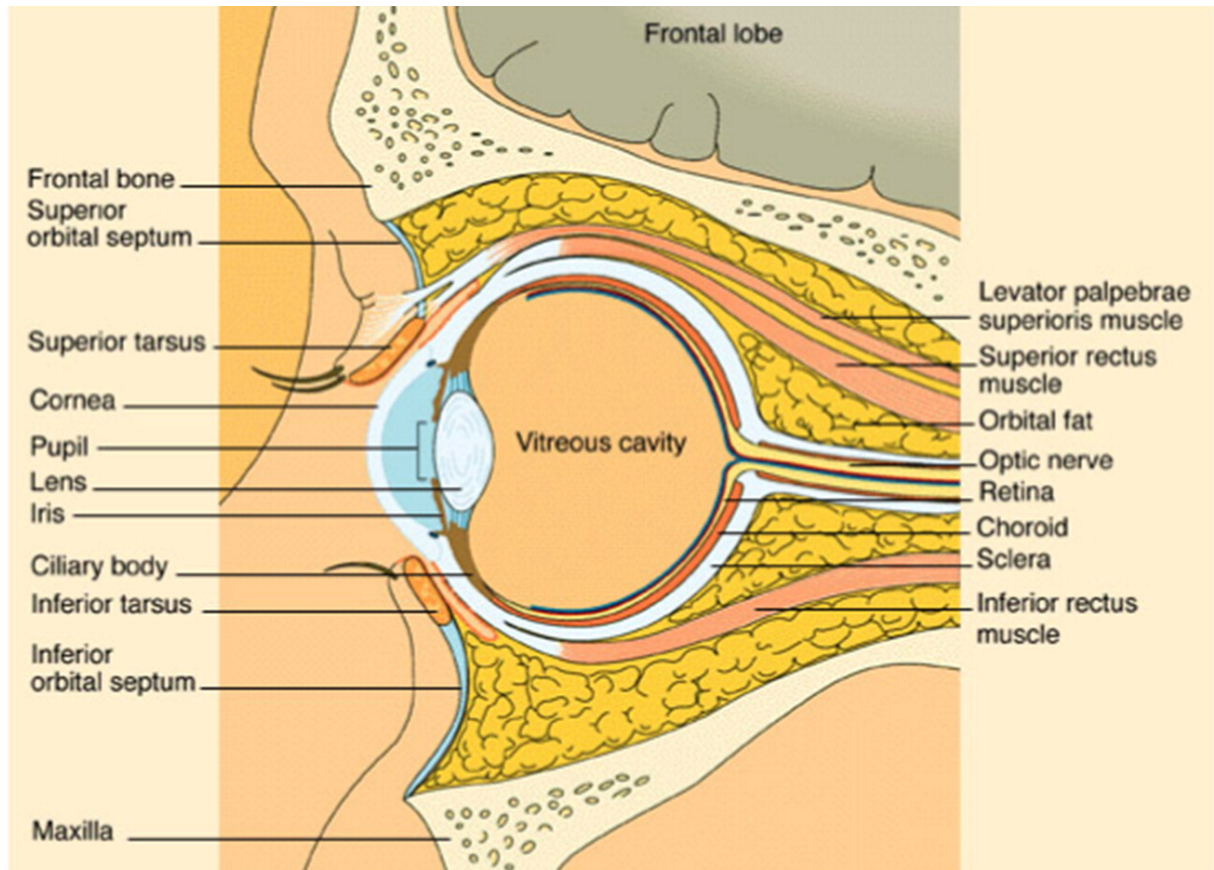


Abb. 1: Überblick orbitaler Strukturen (Kels, Grzybowski and Grant-Kels, 2015).

2.3. Fibroblasten

Neben Fettzellen und interstitiellen Zellen gehören Fibroblasten zu den ortsständigen Zellen des Bindegewebes. Die langlebigen Zellen bilden die extrazelluläre Substanz (Matrix) und kontrollieren auch ihre Zusammensetzung. Aktive Zellen werden in der Regel als Fibroblasten, ruhende Zellen hingegen häufig als Fibrozyten bezeichnet. Der Begriff Fibroblast beschreibt mehrere morphologisch ähnliche, funktionell jedoch sehr unterschiedliche Zellformen. Im Bindegewebe finden sich auch Mesenchymzellen mit Stammzellcharakter, die sich morphologisch nicht sicher von den Fibroblasten unterscheiden lassen. Oft liegen Fibroblasten parallel zu Kollagenfasern, deren Gestalt variieren kann. Die spindelförmigen Zellen zeigen lange, schlanke, meist verzweigte Fortsätze, wobei sich lediglich der spindelförmige Zellkern im Paraffinschnitt erkennen lässt. In den verschiedenen Organen zeigen sie eine unterschiedliche Gestalt, hier

wird ein Zusammenhang mit den speziellen, organspezifischen Aufgaben vermutet. Der Zellkern der Fibroblasten ist meist länglich und heterochromatinreich (dunkel), das Zytoskelett hoch differenziert, ihre Intermediärfilamente sind aus Vimentin aufgebaut. Aktive Zellen zeigen reichlich entwickelte Zellorganellen (z.B. viel RER in Zellen, die große Mengen an Kollagen, Elastin, Fibrillin oder Proteoglykanen bilden). Vesikel wandern, vom Golgi-Apparat ausgehend, zur Zelloberfläche, wo sie die Matrixkomponenten sekretieren. Des Weiteren findet man Aktin und assoziierte Proteine konzentriert in der Zellperipherie. Auch Myosin II wurde bereits nachgewiesen. Den Fibroblasten wird über diese Proteine eine Fortbewegung ermöglicht, welche mit Geschwindigkeiten von bis zu 1 $\mu\text{m}/\text{Minute}$ beobachtet wurde. Über membranständige Integrine sind sie mit Matrixkomponenten wie dem Fibronectin verbunden, jedoch handelt es sich hierbei um eine eher schwache Bindung. Speziell das Aktin beeinflusst ständig die Ausrichtung der Matrixkomponenten, z.B. der Kollagenfibrillen oder fibrillärer Fibronectinaggregate.

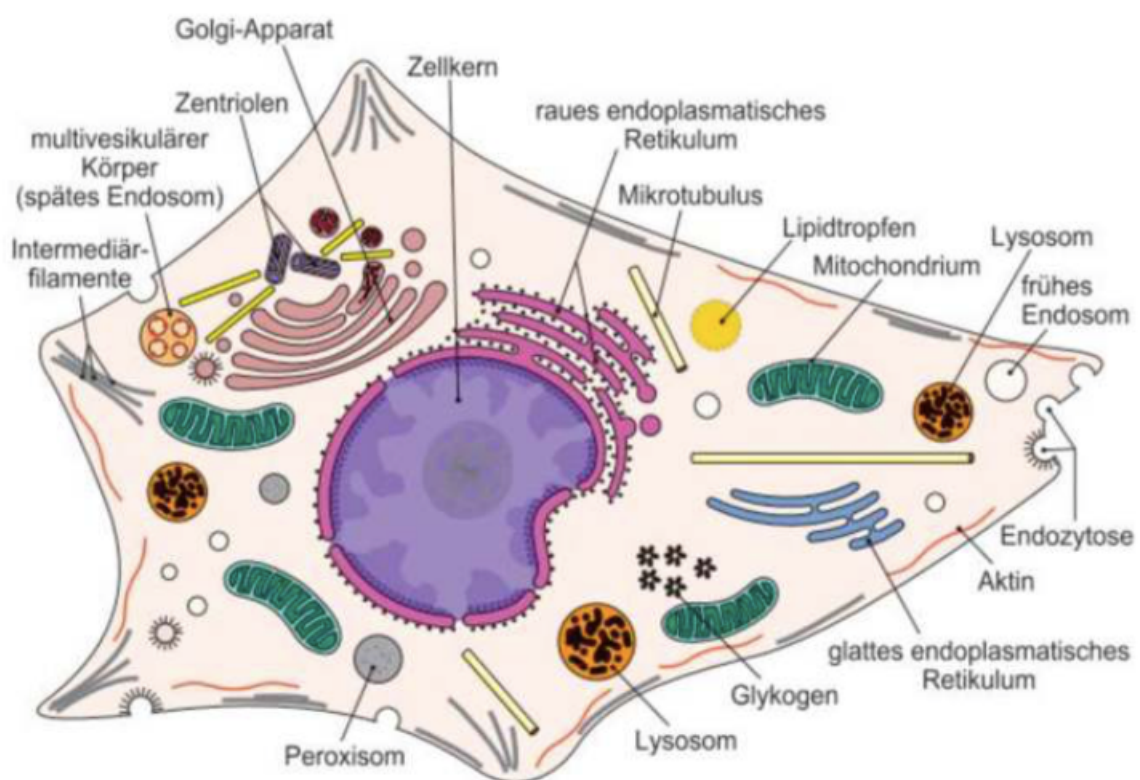


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Fibroblasten mit Verteilung der typischen Organellen und Zytoskelettkomponenten (Deller, 2018).

Zu ihren Aufgaben zählen der Stoffwechsel der Matrix-Bestandteile, vor allem die Neusynthese und die Überwachung des Abbaus. Klinisch relevant sind pathologische

Überaktivitäten von Fibroblasten aufgrund chronisch entzündlicher Prozesse. Diese führen zur Kollagenvermehrung (Fibrose, Sklerose) und somit auch zu Funktionseinschränkungen von Geweben oder Organen.

2.4. Morbus Basedow

Unter den Autoimmunerkrankungen zeichnet sich der Morbus Basedow durch ein bemerkenswertes Alleinstellungsmerkmal aus. Während andere Autoimmunerkrankungen im Allgemeinen zu einem progressiven Zerfall der Zielgewebe führen, stimuliert der Morbus Basedow seine Zielgewebe kontinuierlich. Schon früh wurden zirkulierende Autoantikörper als Ursache der Erkrankung identifiziert, was einem breiten Forschungsfeld den Weg ebnete.

2.4.1. Epidemiologie

Der Morbus Basedow ist eine der verbreitetsten Autoimmunerkrankungen, mit einem Lebenszeitrisko von 3% für Frauen und 0,5% für Männer. Die jährliche Inzidenz wird mit 16 Fällen/100.000 Frauen und 3 Fällen/100.000 Männer beschrieben. Die Erkrankungsdauer variiert zwischen 30 und 60 Jahren (Smith and Hegedüs, 2016). Eine Inzidenzspitze zeigt sich zwischen dem 20. und 39. Lebensjahr (Furszyfer et al., 1972). Die Erkrankung kann in jedem Alter ihre Erstmanifestation zeigen, doch wird die Mehrzahl der Diagnosen zwischen 35 und 40 gestellt (Holm et al., 2005). Außerdem lässt sich eine höhere Inzidenz im asiatischen Raum verzeichnen, während eine geringere Inzidenz südlich der Sahara, auf dem afrikanischen Kontinent besteht (McGrogan et al., 2008; Shapira, Agmon-Levin and Shoenfeld, 2010). In jodreichen Ländern treten häufiger Erkrankungen auf (Laurberg et al., 1991). Außerdem konnte ein erhöhtes Karzinomrisiko der Schilddrüse nachgewiesen werden, vor allem, wenn die Patienten Schilddrüsenknoten aufwiesen. Dabei war eine großzellige Variante des Papillarschilddrüsenkarzinoms häufiger vertreten in Patienten mit Morbus Basedow (MacFarland et al., 2018; Spinelli et al., 2004). Die Endokrine Orbitopathie, auf welche im Folgenden noch ausführlich eingegangen wird, tritt als häufige Komorbidität, in ca. 40% der Fälle auf (Perros et al., 1993).

2.4.2. Genetik

Zwischen 25% und einem Drittel der Erkrankten haben Verwandte ersten Grades, die ebenfalls an Morbus Basedow oder einer anderen Autoimmunerkrankung der Schilddrüse leiden, was einen signifikanten Anteil genetischer Faktoren vermuten lässt (Vaidya, Kendall-Taylor and Pearce, 2002). Für die Endokrine Orbitopathie besteht in der Generation der Nachkommen ein 7-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko (Dittmar et al., 2011). Die Erkrankungsanfälligkeit wurde u.a. in Zwillingsstudien untersucht. Den erblichen Faktoren wird hiernach der dominante Part zugesprochen, denn vermutlich basieren bis zu 79% des Risikos auf diesen (Brix et al., 2001). Bisher konnten Allele an drei Genloci identifiziert werden, welchen eine besondere Bedeutung zugesprochen wird. Dazu zählen der Major Histokompatibilitätskomplex, der Locus für das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen-4 und das Gen der Protein-Tyosin-Phosphatase-22. Jedoch weisen weitere Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise der Lupus Erythematodes, die rheumatische Arthritis oder der Morbus Addison, ebenfalls einen Zusammenhang mit diesen Allelen auf. Somit bestimmen diese Gene maßgeblich die Prädisposition für Autoimmunität des Morbus Basedow und dem begleitenden Auftreten weiterer Autoimmunerkrankungen (Criswell et al., 2005).

2.4.3. Endogene Faktoren

Es imponiert eine weibliche Prädominanz und der Polymorphismus des Östrogenrezeptor ESR2. Hormonelle Variationen können während der Schwangerschaft oder der Menopause die Schwankungen der Symptome ausgleichen (Kisiel et al., 2008). Die X-Inaktivierung und auch Östrogene können bei Frauen die Immunantwort verändern, wodurch der Morbus Basedow begünstigt wird. Des Weiteren wird ein Mikrochimärismus als wichtiger endogener Faktor betrachtet (Brix and Hegedüs, 2012; Cirello et al., 2015).

2.4.3 Umweltfaktoren

Das Rauchen von Zigaretten stellt zusammen mit Stress den wichtigsten Risikofaktor dar. Die starke Assoziation wird durch eine Metaanalyse von acht Studien belegt, welche mit einer Odds Ratio von 3.3 den Zusammenhang unterstreicht (Vestergaard, 2002). Des Weiteren finden sich verschiedene Studien, welche den Zusammenhang zu Stress belegen wollen (Winsa et al., 1991; Yoshiuchi et al., 1998; Strieder et al.,

2003). So beschreiben u.a. Winsa et al. einen Zusammenhang zu negativen Lebensumständen, welche im Jahr vor Erkrankungsausbruch auftraten (Winsa et al., 1991 und Yoshiuchi et al., 1998). Daneben spielen Schwangerschaft und Oestrogeneinnahme eine wichtige Rolle. So wird eine abgelaufene Schwangerschaft als Risikofaktor, die Oestrogeneinnahme, meist als Kontrazeptivum, jedoch als protektiver Faktor gegen den Morbus Basedow diskutiert (Strieder et al., 2003).

Gegenstand weiterer Diskussionen bietet der Einfluss des Immunsystems, welcher vor allem bei Infektionen, Allergien und auch durch iatrogenes Wirken das Auftreten der Erkrankung begünstigen kann. Nach immunsuppressiven Phasen kommt es zu einer Wiederherstellung der Immunantwort, wobei die erneute Exposition des Immunsystems von Schilddrüsen-Antigenen vermutlich zum Morbus Basedow führt. Dies lässt sich an bis zu 30% der Multiple Sklerose Patienten beobachten, welche eine T-Zell-senkende Therapie mit Alemtuzumab erhielten (Coles et al., 1999). Ein geringer Anteil der Fälle weist einen unmittelbaren zeitlichen Zusammenhang zu allergischen Erkrankungsbildern auf, wie beispielsweise der allergischen Rhinitis. Symptom-determinierend sind hohe Serum IgE-Konzentrationen (Hidaka et al., 1993; Sato et al., 1999).

Infektionskrankheiten werden als Triggerfaktoren von autoimmunbedingten Schilddrüsenerkrankungen diskutiert (Davies, 2008). Gegenstand der Diskussion stellen insbesondere das Parvovirus-19, das Epstein-Barr-Virus, das Hepatitis-C-Virus und das Humane Foamy Virus dar (Antonelli et al., 2020).

2.4.4. Immunpathogenese

Bereits vor Jahrzehnten wurde die Rolle der TSH-Rezeptor stimulierenden Antikörper beschrieben, die zum Hyperthyreodismus und zur Schilddrüsenhyperplasie führen (Adams et al., 1974). Diese Erkenntnis konnte durch zahlreiche Publikationen untermauert werden (Diana et al., 2014; Diana et al., 2015; Kahaly et al., 2018). Die stimulierenden Antikörper, genannt Graves' Disease TSHR-Stimulating Antibodies (TSAbs), lassen sich via Immunoassay in >95% darstellen (Smith et al., 2004). Es handelt sich um die IgG1-Subklasse, die ein Epitop der extrazellulären Domäne des TSH-Rezeptors angreift (Costagliola et al., 2004). Die Bindung der TSAbs aktiviert die intrazellulären G-Proteine, die in Verbindung mit dem TSH-Rezeptor stehen. Durch den cAMP und Phospholipase C Weg impliziert dies auch die Transkription der

Thyreoglobulin (Tg) codierenden Gene, Enzymen wie der Thyreoperoxidase (TPO) und dem Natrium/Iodid-Transporter. Die fluktuierende Symptomatik einiger Patienten lässt sich durch das Auftreten blockierender Antikörper erklären (Weetman, 1991). Diese blockierenden Antikörper binden ebenfalls am TSH-Rezeptor, blockieren die TSH vermittelte Aktivierung und führen somit zum Hypothyreoidismus (Li et al., 2013; Diana et al., 2016; Diana, Olivo and Kahaly, 2018). Aktivierende sowie blockierende Antikörper können bei Patienten gleichzeitig vorliegen (Evans et al., 2010).

Die Mehrzahl der Patienten weist jedoch Antikörper gegen weitere Schilddrüsenantigene auf, vor allem gegen die Thyreoperoxidase (TPO), Thyreoglobulin (Tg) und dem Natrium/Iodid-Transporter. Die Anti-TPO-Antikörper stellen hierbei die häufigste und vermutlich wichtigste Klasse dar (Beever et al., 1989).

Als Charakteristikum des unbehandelten Stadiums des Morbus Basedow, zeigt sich die Schilddrüse hyperplastisch mit einem B- und T-Zell-Infiltrat. Die Schilddrüsen Antikörper werden vor allem von den aus B-Zellen hervorgehenden Plasmazellen gebildet, wobei auch aktivierte B-Zellen in benachbarten Lymphknoten, der Milz oder des Thymus geringere Mengen an Antikörpern bilden können (Weetman et al., 1982). Die antikörperbildenden B-Zellen werden wiederum von aktivierten intrathyroidalen T-Zellen reguliert (Nakashima, Martin and Davies, 1996).

2.4.5. Diagnostik

Patienten mit Morbus Basedow können auf sehr unterschiedliche Weise klinisch vorstellig werden. Es zeigen sich eher unspezifische Symptome, die die Patienten i.d.R. über 3-6 Monate belasten, ehe diese ärztliche Hilfe in Anspruch nehmen. Eine beträchtliche Zahl der Patient*innen leidet unter Gewichtsverlust, obwohl subjektiv ein gesteigertes Appetitempfinden vernommen wird. Phasen der Erschöpfung können mit Unruhezuständen alternieren. Gelegentlich berichten die Patient*innen über einen Tremor der Hände oder auch inadäquaten Angstgefühlen. Häufig wird das gesteigerte Wärmeempfinden mit vermehrtem nächtlichen Schwitzen beschrieben, welches neben der physischen Unruhe zu einer verminderten Schlafqualität führt. Bei weiblichen Patienten ergeben sich anamnestisch häufig Unregelmäßigkeiten der Menstruation.

Gelegentlich imponiert eine sicht- bzw. tastbare Struma über welcher man das systolische Herzgeräusch vernehmen kann. Des Weiteren sind Betablocker-resistente

Tachykardien keine Seltenheit. Ein erhöhter systolischer Blutdruck, Hepatomegalie und Splenomegalie sowie das pretibiale Myxödem sind als wegweisende Befunde zu betrachten. Neben weiteren Symptomen sollten Anzeichen der Endokrinen Orbitopathie, welche im nächsten Kapitel ausführlich beschrieben wird, stets an das Vorliegen eines Morbus Basedow denken lassen.

Laborchemisch lässt sich die Diagnose durch eine Erhöhung von fT3 und oder fT4 begleitend zu einem supprimiertem TSH-Wert stellen. Mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit schließen gering messbare TSH Werte einen Morbus Basedow aus. Daneben können auch nicht messbare TSH-Werte mit normalen fT3 bzw. fT4 Werten einhergehen, was per Definition einem subklinischen Hyperthyreoidismus entspricht. In diesem Fall sollte eine weitere Antikörperdiagnostik angestrebt werden.

Sollten extrathyroidale Zeichen des Morbus Basedow vorliegen, wird von weiteren Testverfahren, welche über die TSH-Wert Bestimmung und der Messung der freien Schilddrüsenhormen fT3 bzw. fT4 hinausgeht, abgeraten. Im Falle von Unklarheiten, z.B. fehlende klinische Symptomatik, wird als Goldstandard ein Assay angewendet, welches die TSHR-stimulierenden Antikörper detektiert. Über 95% der Morbus Basedow Patienten zeigen hier ein positives Testergebnis (Smith et al., 2004). Daneben sind weitere Serum Antikörper-Messungen möglich. Vor allem sollte auch eine Ultraschall Untersuchung der Schilddrüse und ggf. eine funktionsmorphologische Szintigrafie erwogen werden.

2.4.6. Behandlungsmöglichkeiten

Die etablierte Therapie des Morbus Basedow beruht maßgeblich auf drei großen Säulen. Neben der medikamentösen Behandlung mit Thionamiden und der Radiojodtherapie, kommen auch chirurgische Verfahren zur Anwendung. Der Gabe eines Betablockers wird ein Benefit zugeschrieben, jedoch stellt eine Komorbidität mit Asthma bronchiale eine Kontraindikation dieser Behandlungsform dar. Im Falle des Vorhofflimmerns ist eine Antikoagulation zur Vermeidung kardiovaskulärer Ereignisse obligatorisch.

Thionamide induzieren eine Remission des Hyperthyreoidismus in ca. 50% der Fälle (Solomon, Beck and Vanderlaan, 1953; Reinwein et al., 1993). Mehrere

Therapieregime kommen zur Anwendung, jedoch konnten weder Abraham et al. noch Cooper eine Überlegenheit eines bestimmten Regimes feststellen (Abraham et al., 2004; Cooper, 2005).

Die Radiojodtherapie, welche eine DNA-Schädigung der Thyreozyten und der nicht-epithelialen Schilddrüsenzellen induziert, führt zur Gewebsnekrose, auf die eine Fibrose und letztlich eine Atrophie folgt. Nach sechs Wochen bis sechs Monaten der Radiojodbehandlung, erreichen die meisten Basedow-Patienten eine zunächst euthyroide und später hypothyroide Stoffwechsellage (Wartofsky, 1997). Trotz zahlreicher Bestrebungen die optimale therapeutische Dosis jedes Patienten zu eruiieren, wie z.B. von Catargi et al., wird vielerorts auf ein pragmatisches Therapieschema vertraut, dass in 70-90% in einer hypothyroidaler Stoffwechsellage resultiert (Catargi et al., 1999). Schwangerschaft sowie Stillzeit stellen eine absolute Kontraindikation der Radioiodtherapie dar. Jedoch sollte auch im Kindesalter und der Adoleszenz nach Möglichkeit von dieser Therapieform abgesehen werden. Betrachtet man die Gruppe der radioiodtherapierten Erwachsenen, so lässt sich kein Hinweis auf ein erhöhtes Tumorrisiko messen (Ron et al., 1998; Franklyn et al., 1999).

Die totale Thyroidektomie wird als Behandlungform des Morbus Basedow kontrovers umstritten. Neben Patient*innen mit Endokriner Orbitopathie, die nach adäquater medikamentöse Therapie rückfällig wurden, eignen sich für diese Therapieform ebenfalls Struma-Patienten*innen und Patient*innen mit schwerer Hyperthyreose, welche zu Kreislaufstörungen neigen und durch Thionamide nicht einstellbar sind (Scholz et al., 2003). Eine transiente Hypocalcämie oder eine operative Läsion des Nervus recurrens laryngeus sollten als etwaige Komplikationen berücksichtigt werden.

2.5. Endokrine Orbitopathie

2.5.1. Ätiologie

Typischerweise tritt die Endokrine Orbitopathie mit einem Morbus Basedow und positiven TSH-Rezeptor-Antikörpern auf. In seltenen Fällen findet sich ursächlich eine Hashimoto-Thyreoiditis mit Antikörpern gegen die Thyroxinperoxidase oder Thyreoglobulin. Eine prospektive Studie des Mainzer-Orbita Zentrums kam zu dem Ergebnis, dass 92,4% der Erkrankten an Morbus Basedow und nur 4,8% an einer Hashimoto Thyreoiditis litten (Ponto et al., 2009). Als häufigste extrathyreoidale

Manifestation des Morbus Basedow kann sie zeitlich sogar vor, während und nach Ausbruch der Schilddrüsenerkrankung auftreten (Bartley et al., 1996). Das Manifestationsalter liegt meist zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr, wobei die Augen in der Regel asymmetrisch stark betroffen sind. Die Erkrankung ist häufiger bei weiblichen Patienten zu finden, jedoch zeigen sich bei Männern oft schwerere Verläufe. Circa 25% der Patienten mit Morbus Basedow entwickeln eine klinisch relevante Orbitopathie, wobei diese Zahl die Lidveränderungen und klinisch irrelevante Muskelschwellungen, die sich aber radiologisch feststellen lassen, nicht berücksichtigt. In 3-5% der Erkrankten ist mit schweren Formen zu rechnen (Kahaly et al., 1997).

2.5.2. Immunpathogenese

Eine übergeordnete Bedeutung wird der Entzündungsreaktion zugeschrieben, welche sich durch eine Infiltration von T-Lymphozyten (CD4+, CD8+, CD45RO+, CD45RB+) auszeichnet. Im Rahmen dieses Prozesses kommt es auch zu einem vermehrten Vorliegen von Plasmazellen und Makrophagen (Saber et al., 1996). Dieser Entzündungsprozess führt zu einer Stimulation der orbitalen Fibroblasten, was durch eine stark gesteigerte Produktion von Kollagen sowie einer Zunahme des Binde- und Fettgewebes resultiert. Begleitend beobachtet man eine überschießende Produktion von Glykosaminoglykanen (GAG) der Fibroblasten, welche im Focus dieser Arbeit untersucht wurde.

Orbitale Fibroblasten gelten gegenüber bestimmten Zytokinen als sehr empfindlich. In der Folge setzen die Fibroblasten proinflammatorische Zytokine (u.a. IL-6 und IL-8) frei, welche den spezifischen Transkriptionsfaktor NF- κ B stimulieren (Sorisky et al., 1996). Eine Volumenzunahme zeigt sich meist am deutlichsten im M. rectus inferior und medialis, wobei das Gesamtvolumen der Augenmuskulatur bis um das Dreifache ansteigen kann. Die Entzündungsreaktion kann zusätzlich durch die Obstruktion orbitaler Venen verstärkt werden, da es zu einer zusätzlichen Ödembildung kommt (Heufelder et al., 1995). Präadipozyten, die einen Teil der orbitalen Fibroblasten darstellen, können sich in Fettzellen umwandeln (Heufelder, Wenzel and Scriba, 1996).

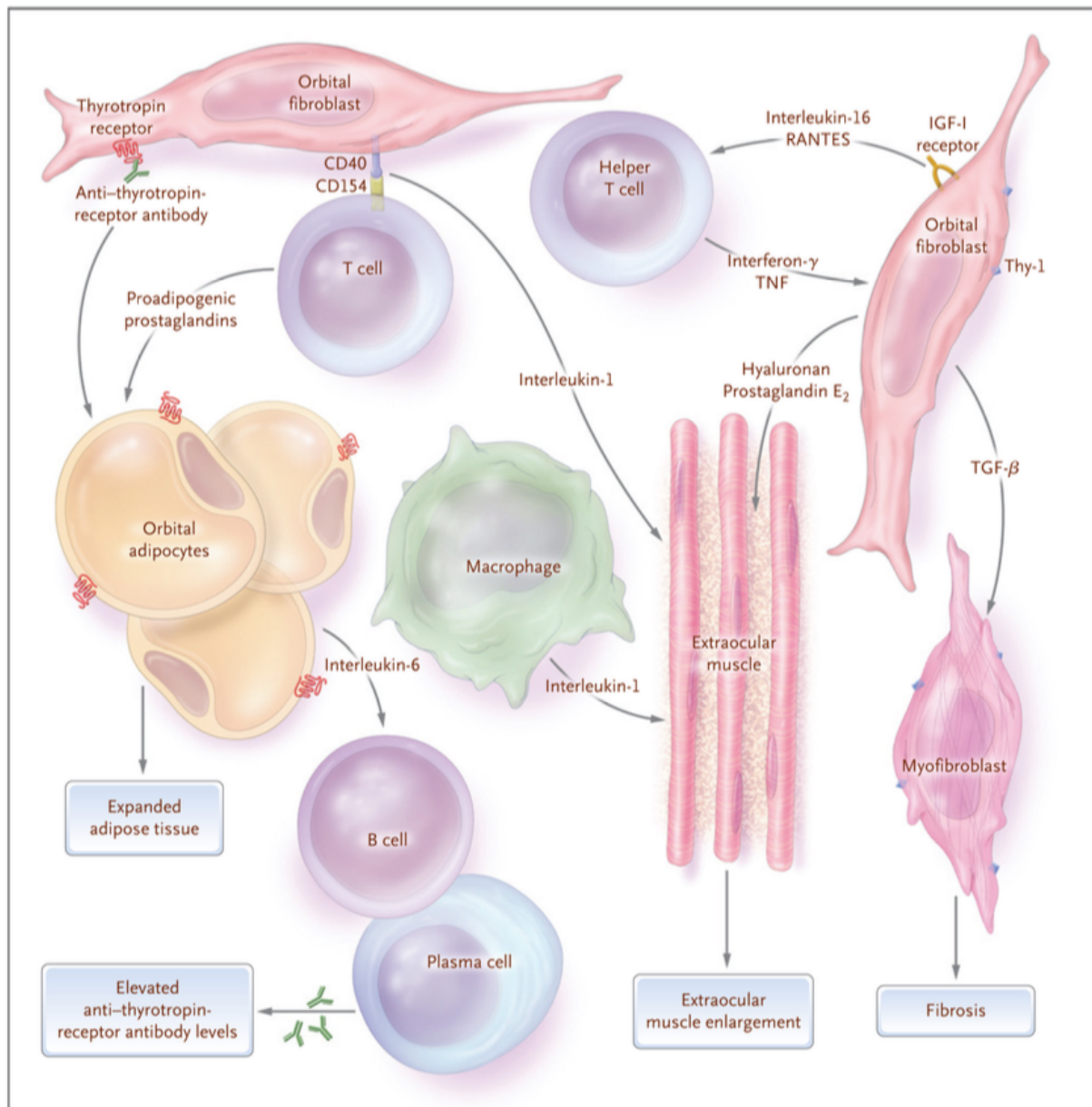


Abb. 3: Interaktionsmodell zwischen orbitalen Fibroblasten und dem Autoimmunprozess (Bahn, 2010).

Darüber hinaus werden Antigengemeinsamkeiten des Orbita- und Schilddrüsengewebes vermutet, da T-Lymphozyten mit einem ähnlichen molekularen T-Zell-Rezeptor-Bestand in beide Gewebearten einwandern (Felicciello et al., 1993; Paschke, Vassart and Ludgate, 1995). Die extrathyreoidale und orbitale Expression des TSH-Rezeptors wird durch zahlreiche Studien beschrieben, was die extrazellulären Anteile des Rezeptors als kreuzreagierende Antigen determinate für orbitale T-Lymphozyten und somit als Zielstruktur der Endokrinen Orbitopathie in Erwägung ziehen lässt (Burch et al., 1994; Crisp et al., 1997; Hiromatsu et al., 1996; Kahaly et al., 1996; Otto et al., 1996; Major, Cures and Frauman, 1997).

Das Immunsystem kann jedoch auch auf weitere orbitale Proteine reagieren, denn obwohl T-Lymphozyten gegenüber autologen Strukturen tolerant sein sollten, reagieren diese mit orbitalen Proteinfragmenten (Perros, Crombie and Kendall-Taylor, 1995; Prummel et al., 1990).

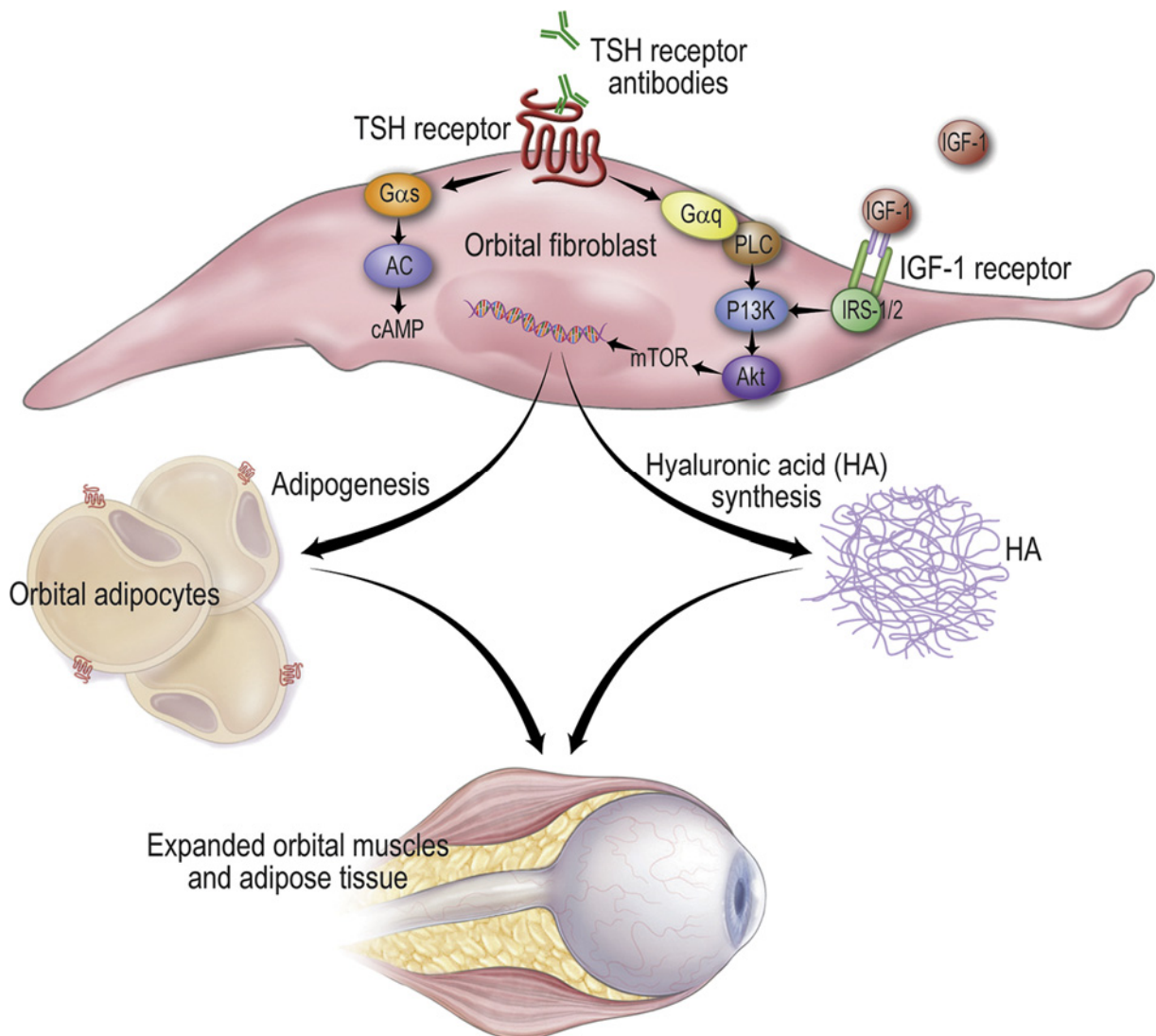


Abb. 4: Die Rolle des TSH-Rezeptors und IGF-1 Rezeptors in der Immunpathogenese der Endokrinen Orbitopathie (Iyer and Bahn, 2012).

2.5.3. Diagnostik

Diagnostisch hat sich ein standardisiertes Stufenschema etabliert, durch welches auch eine Verlaufsbeurteilung ermöglicht wird (Ponto et al., 2009). Anamnestisch wird seitens der Patient*innen meist eine langsam progrediente Symptomatik beschrieben, welche in den Morgenstunden ausgeprägter ist (Wiersinga-Kahaly, 2010). Zu den Symptomen zählen das Fremdkörpergefühl, Schmerzen, Druckgefühl, Lichtempfindlichkeit, lokale Entzündungen, Augentränen oder Motilitätsstörungen, die

mit konsekutiven Doppelbildwahrnehmungen einhergehen kann. Klinisch imponieren jedoch vor allem die Lidretraktion und der Exophthalmus, welche je nach Ausprägung zu einem unvollständigen Lidschluss führen und somit Hornhautbenetzungsstörungen bis hin zum Ulcus den Weg ebnen können. Als besonders schwerwiegende Komplikation gilt die Einklemmung des Nervus opticus, die eine Visusminderung, Gesichtsfeldausfälle oder auch eine Erblindung bedingen kann (Kalmann and Mourits, 2002; Kendler, Lippa and Rootman, 1993). Als Erstsymptom der EO kommt auch die Sicca-Symptomatik in Frage, welche den Augenarzt schon früh an die Differentialdiagnose EO denken lassen sollte (Gupta, Sadeghi and Akpek, 2009).

Die Hertel-Exophthalmonetrie bietet eine Möglichkeit der Objektivierung des Exophthalmus, die Aktivität der Endokrinen Orbitopathie wird hingegen anhand des „Clinical Activity Score“ (CAS) bestimmt (Mourits et al., 1997). Der CAS berücksichtigt in einer binären Einteilung Schmerzen, Lidschwellung/-rötung, Plika-/Karunkelschwellung und Bindehaut-schwellung/-rötung, für welche er insgesamt sieben Punkte verteilt. Als aktiv wird die Endokrine Orbitopathie ab einem Score von drei angesehen. Daneben bietet sich zusätzlich eine Klassifikation des Schweregrades an, welche durch ein Schema mit sechs Klassen vorgenommen wird (Kendler, Lippa, Rootman in Wiersinga-Kahaly, 2010). Nach der europäischen interdisziplinären Arbeitsgruppe (EUGOGO) unterscheidet man zwischen milder, moderater-schwerer und Sehkraft-beeinträchtigender Endokriner Orbitopathie (Bartalena et al., 2008).

Zur Diagnosestellung ist die laborchemische Bestimmung der basalen Serumwerte für TSH sowie fT3 und fT4 obligatorisch. Hier lässt sich in enger zeitlicher Korrelation der Erkrankungsmanifestation meist eine Hyperthyreose messen (Lazarus, Marino in Wiersinga-Kahaly, 2010). Bei klinisch uneindeutigen Befunden kann eine Zuordnung über die Bestimmung der Schilddrüsenautoantikörper vorgenommen werden. Die Höhe des ermittelten TSH-Rezeptor-Antikörper-Titer korreliert in ca. 50% der Patienten mit der Symptomschwere und dem Erkrankungsverlauf (Eckstein et al., 2006). Weitere diagnostische Methoden, welche selbstredend auch bei der Endokrinen Orbitopathie gelten, wurden bereits unter der Grunderkrankung Morbus Basedow beschrieben.

2.5.5. Behandlungsmöglichkeiten

Eine übergeordnete Rolle nimmt die Behandlung der Schilddrüsenfehlfunktion ein, mit welcher sehr oft bereits eine Symptomlinderung einhergeht (Benker, Kahaly and Reinwein, 1999). Thyreostatika wie Methimazol hemmen effektiv die Bildung freier Radiakle (Weetman et al., 1984). Da man sich bislang keiner kausaler Therapieoptionen bedienen kann, stehen eine Reduktion lokaler Beschwerden, die Hemmung der Autoimmunphänomene und die Prävention möglicher Komplikationen im Mittelpunkt. Allen Patienten mit Sicca-Symptomatik sollten mit Augentropfen und/oder -salben behandelt werden.

2.5.5.1. Immunsuppressive Therapie

Im Zentrum der Akuttherapie stehen nach wie vor die Glukokortikoide, denen über 70% der Patienten ein Benefit zuschreiben können (Kahaly und Wiersinga-Kahaly, 2010). Hierbei beruht die antiinflammatorische Wirkung der Glukokortikoide auf der Hemmung des Transkriptionsfaktor NF- κ B (Kazim, Goldberg and Smith, 2002).

Die intravenöse Applikation ist aufgrund einer höheren Wirksamkeit und besseren Verträglichkeit der oralen Gabe überlegen. Diese Überlegenheit konnte durch randomisierte Studien belegt werden (Kahaly et al., 2005). Im Falle einer Beteiligung des Nervus opticus sollte eine hochdosierte i.v. Therapie mit 500 mg Methylprednisolon über drei Tage erfolgen. Ein unzureichendes Ansprechen (beurteilt anhand der Parameter Visus, Gesichtsfeld, Sehnervenschwellung, relatives afferentes Pupillendefizit, Farbentsättigung, visuell evozierte Potenziale) macht eine Orbitadekompression jedoch unumgänglich. Kumulative Gesamtsteroiddosen von über 10 g Methylprednisolon werden mit einer Lebertoxizität, insbesondere nach abgelaufener Virushepatitis, diskutiert (Le Moli et al., 2007; Marínó et al., 2004; Salvi et al., 2004; Weissel and Hauff, 2000).

Bei Versagen der Glukokortikoide kommen nicht-steroidale Immunsuppressiva zum Einsatz (Kahaly und Wiersinga-Kahaly, 2010). Die Applikation dieser Substanzen bietet Vorteile bei der Weichteilbehandlung, doch wird die Therapie durch ein Infektionsrisiko, Nebenwirkungen und hohe Behandlungskosten flankiert (Kahaly et al., 1996). Ciclosporin, welches die Transkription des IL-2-Gens und die TSH-Rezeptor-Antikörperproduktion hemmt, wurde in Kombination mit Glukokortikoiden in

einer Studie von Kahaly et al. eine Überlegenheit gegenüber der Monotherapie mit Glukokortikoiden attestiert (Kahaly et al., 1986).

Immunmodulatorische Einflüsse wurden auch Antioxidanzien, vor allem aber dem Spurenelement Selen, zugeschrieben (Gärtner et al., 2002; Gärtner and Gasnier, 2003). Durch Untersuchungen konnte ein Nachweis über den protektiven Effekt und die Modulation autoaggressiver Mechanismen erbracht werden (Marcocci et al., 2011; Spallholz, Boylan and Larsen, 1990). Aufgrund des geringen Nebenwirkungsprofils ist eine antioxidative Therapie bei Patienten mit endokriner Orbitopathie als mögliche Therapieergänzung gemäß der Studie bei milder EO zu erwägen.

2.5.5.2. Radiotherapie

Die Retrobulbärbestrahlung bietet eine entzündungsmodulierende Alternative zu immunsuppressiven Therapien, die sich durch eine vergleichbare Effektivität und ein geringeres Nebenwirkungsprofil auszeichnet. Die Effektivität wurde von verschiedenen Gruppen untersucht.

Sechs Monate nach einer 10 x 2 Gy Bestrahlung konnten Mourits et al. eine Besserung der Motilität und Diplopie bei moderat bis schwer verlaufenden Formen feststellen (Mourits et al., 2000). Im Falle der mild verlaufenden EO konnten Prummel et al. bei gleichem Bestrahlungsschema erst nach 12 Monaten eine Symptomlinderung feststellen (Prummel et al., 2004). Weitere Studien von Gerling et al. und Gorman et al. stellen diese Ergebnisse in Frage, allerdings erhielt hier auch die Placebogruppe eine Strahlendosis von 2,4 Gy bzw. 2 Gy, was neben biologischen Effekten der Lymphozytenmigration und gewählter Einschlusskriterien der Studienpatient*innen einen Erklärungsansatz bietet (Gerling et al., 2003; Gorman et al., 2020; Rajendram et al., 2012). Das klinische Ansprechen konnte von Kahaly et al. mit 20x1 Gy (wöchentlich) mit 67% angegeben werden (Kahaly et al., 2000). Somit trägt die Orbitabestrahlung insbesondere bei aktiven Formen einer moderaten bis schweren EO effektiv zur Motilitätsbesserung und einer Reduzierung der Krankheitsaktivität bei (Bartalena et al., 2008).

Die Effektivität einer kombinierten Behandlung mit oralen Glukokortikoiden und Retrobulbärbestrahlung wurde belegt (Prummel et al., 1993). Die schnelle Wirksamkeit der Glukokortikoide wird durch ein zeitlich versetztes Einsetzen der

Bestrahlungseffekte begleitet, was zu einer Reduktion von Rückfällen führt (Wiersinga and Prummel, 2002). Die Überlegenheit der Therapiekombination wurde von Bartalena et al. bestätigt (Bartalena et al., 1983; Bartalena et al., 2008).

Die Retrobulbärbestrahlung kann ebenso mit der intravenösen Applikation von Glukokortikoiden kombiniert werden. Dieses Schema beansprucht die höchste Effektivität und eine geringe Komplikationsrate als sie bei der oralen Steroidgabe zu beobachten ist (Marcocci et al., 2001).

In aller Regel wird die Retrobulbärbestrahlung bis 20 Gy gut vertragen, nur ca. 35% entwickeln eine reversible Konjunktivitis (Kahaly et al., 2000). Bei Patienten mit präexistenten Mikroangiopathien, z.B. nach bei bestehendem Diabetes mellitus oder arterieller Hypertonie, konnten radiogene Retinopathien beobachtet werden (Bartalena et al., 2008). Der Diabetes mellitus stellt eine relative Kontraindikation der Retrobulbärbestrahlung dar. Die Risiken einer Kataraktentwicklung sind aufgrund guter Therapiemöglichkeiten zu vernachlässigen. Lediglich 10% der mit 20 Gy therapierten Patient*innen, entwickelten binnen zehn Jahren einen klinisch signifikanten Katarakt (Marcocci et al., 2003; Marquez et al., 2001). Das Malignomrisiko kann ebenfalls vernachlässigt werden (Marcocci et al., 2003; Marquez et al., 2001).

2.5.5.3. Orbitadekompression

Die Orbitadekompression verfolgt das Ziel einer Reduktion des intraorbitalen Druckes und somit auch die Reduktion des Exophthalmus, der Oberlidretraktion und einer Motilitätsverbesserung. In etwa 5% der Patienten mit EO zeigt sich eine schwere Verlaufsform (Cascone et al., 2012).

Indiziert sind operative Interventionen als Zweitlinientherapie nach Ausschöpfung der konservativen Behandlungsmöglichkeiten, im Falle einer therapieresistenten Dysthyreote Optikusneuropathie (DON) mit rapiden Visusverlust und auch bei inaktiven Formen, um kosmetischen Korrekturen gerecht zu werden (Cascone et al., 2012; Verity and Rose, 2013; Kahaly et al., 2007).

In der Literatur wird zwischen drei verschiedenen OP-Formen unterschieden. Neben der knöchernen Dekompression gilt die transpalpebrale Fettgewebsdekompression als gängige Vorgehensweise (Olivari, 2010). Beide Verfahren sind kombinierbar. Werden mediale und laterale Orbitawand gleichzeitig entfernt, spricht man von balancierter Dekompression (Shepard, Levin and Terris, 1998). Diese Methode verschafft den orbitalen Strukturen Raum und reduziert somit postoperative Doppelbilder (Shepard, Levin and Terris, 1998; Siracuse-Lee and Kazim, 2002). Eine Bewertung der unterschiedlichen Methoden ist nur schwer möglich, da nur wenige evidenzbasierte Studien vorliegen (Boboridis and Bunce, 2011).

Postoperativ kommt es in Folge der intraorbitalen Druckreduktion nach einseitiger Dekompression zum Absinken des CAS sowohl auf operierter als auch auf nicht operierter Seite (Leong et al., 2009). Der Exophthalmus kann reduziert, die arterielle Durchblutung und die venöse Drainage verbessert werden, woraus letztlich ein Visusanstieg resultiert (Onaran et al., 2014; Takahashi et al., 2014; Verity and Rose, 2013). Auch Clauser et al. konnten eine Normalisierung der visuell evozierten Potenziale messen (Clauser et al., 2012). Allerdings ist die Studienlage zur Visusverbesserung als heterogen zu betrachten. Zur Reduktion des Exophthalmus bestehen ebenfalls sehr unterschiedliche Angaben. Eine Studie von Alsuhaibani et al. maß eine Reduktion von 2,53mm, wohingegen Wang et al. eine Reduktion von 8,1 mm feststellen konnten (Alsuhaibani et al., 2011; Wang et al., 2013). Mit Ausnahme von Olivari, 2010 ergibt sich die Schlussfolgerung, dass eine Kombination an knöcherner Dekompression und Fettgewebsresektion zu einem stärkeren Rückgang der Proptosis führt (Olivari, 2010; Boboridis and Bunce, 2011; Chang, Baek and Lee, 2013).

Betrachtet man die Reduktion der Doppelbilder, so lässt sich kein einheitliches Studienbild erkennen (Gerling et al., 2003; Souchier et al., 2013; Unal et al., 2003). Allerdings kann eine Abhängigkeit vom OP-Verfahren vermutet werden. Geringe Raten an postoperativen Doppelbildern sind nach der reinen Fettgewebsreduktion zu erwarten, wohingegen vor allem die knöchernerne Zwei-Wand-Dekompression, verglichen zur alleinigen lateralen Dekompression, mit einer höheren Rate imponiert (Olivari, 2010; Goldberg et al., 2000; Rocchi et al., 2012; Verity and Rose, 2013).

Die Komplikationsrate wird in der Metaanalyse von Leong et al. mit 9,3% beschrieben, wobei hier das Operationsverfahren eine nicht unerhebliche Rolle zu spielen scheint (Leong et al., 2009). Neben okulären Komplikationen wie der Visusverschlechterung, den Bulbusmotilitätsstörungen, dem Bulbustiefstand oder der Oszillose, treten gelegentlich sinugene Komplikationen wie z.B. Blutungen, Sinusitis oder Adhäsionen und Synechien auf. Zu intrazerebralen Komplikationen kommt es nur selten.

2.5.5.4. Lidchirurgie

Im inaktiven Stadium der Erkrankung kann eine Korrektur der Lidfehlstellungen erwogen werden, wobei hier der Lagophthalmus, die Lidretraktion und die Ptosis die häufigsten Indikationen im Rahmen der Endokrinen Orbitopathie darstellen. Eine etwaige Dekompression und jegliche Formen der Strabismuschirurgie sollten bereits vor der Lidoperation erfolgt sein (Rootman, 2003). Weitere OP-Indikationen ergeben sich durch eine Dermatochalasis oder einem orbitalen Fettprolaps.

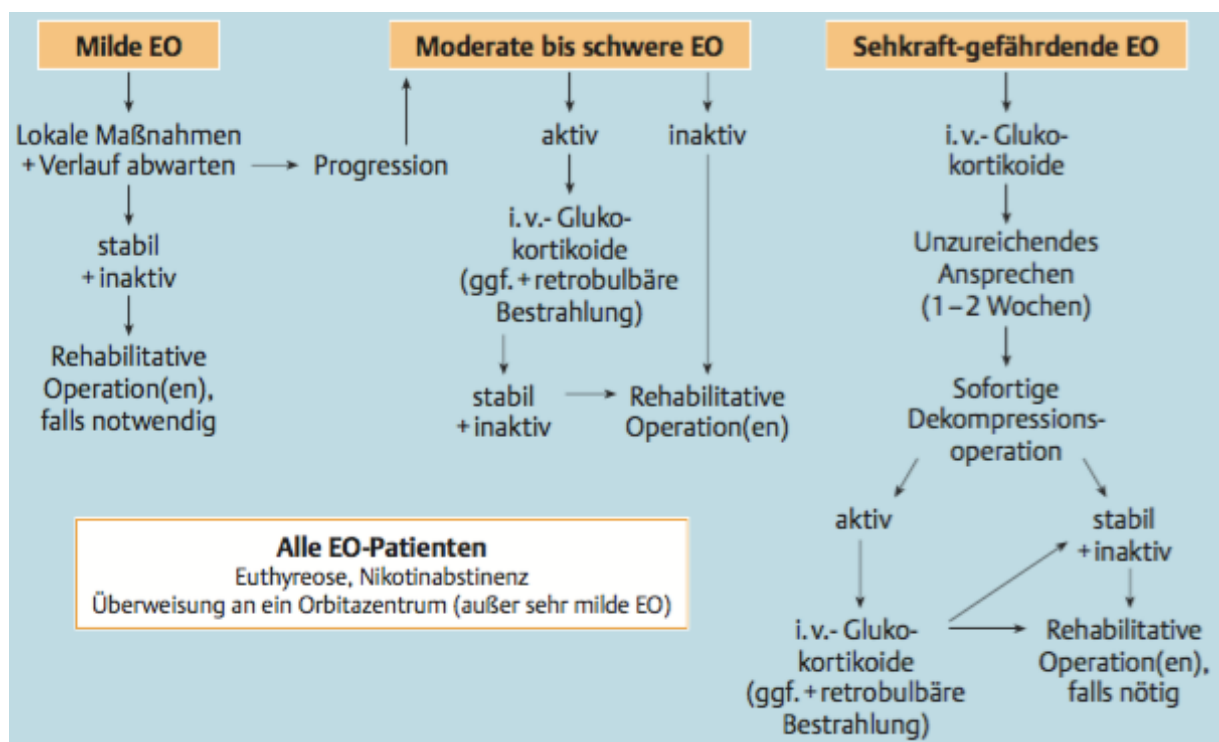


Abb. 5: Evidenzbasiertes, interdisziplinäres Management der EO. Die rehabilitativen Operationen umfassen die Entlastungs- und Schieloperation sowie lidchirurgische Eingriffe (Ponto et al., 2009).

2.6. Stimulationsversuche

Der TSH-Rezeptor in orbitalen Fibroblasten stellt ein wesentliches Ziel der Autoimmunattacke des Morbus Basedow dar (van Zeijl et al., 2012). Die Pathogenese der Endokrinen Orbitopathie beruht auf der Aktivierung dieses G-Protein gekoppelten Rezeptors, welcher von orbitalen Fibroblasten exprimiert wird (van Zeijl et al., 2011). Dabei bindet TSH an der extrazellulären Region und aktiviert in der Folge den cAMP-Signalweg (Kleinau et al., 2010). Jedoch spielen hierbei auch stimulierende und blockierende Autoantikörper, die sich gegen den TSH-Rezeptor richten, eine wichtige Rolle in der Pathogenese (Diana et al., 2020). Stimulierende Antikörper führen durch Aktivierung des 3',5' cAMP-Signalwegs zum Hyperthyreodismus und blockierende Autoantikörper durch Inhibition zum Hypothyreodismus (Diana et al., 2020). Stimulationsversuche dieses Signalwegs von van Zeijl et. al. erhärteten die Hinweise auf eine gesteigerte Sekretion von cAMP sowie eine vermehrte Hyaluronsäure-Synthese durch die drei HA-Synthetasen (HAS1, HAS2, HAS3) (van Zeijl et al., 2011).

2.6.1.1. Die Rolle des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP)

In den vergangenen Dekaden stand bei Stimulationsversuchen orbitaler Fibroblasten neben der Hyaluronsäure vor allem die Messung des cAMP im Fokus internationaler Arbeitsgruppen.

Bereits Reddy et. al. beschrieben einen bestimmten Phänotyp orbitaler Fibroblasten, welcher sich von anderen Fibroblasten unterscheidet (Reddy et al., 1998). Dabei reagieren sie zum einen anders als beispielsweise dermale Fibroblasten auf proinflammatorische Zytokine und Hormone, aber auch die Struktur ihrer Rezeptoren und die Expression ihrer Ganglioside und Glykosaminoglykane variiert (Smith et al., 1992, Cao et al., 1995, Wang et al., 1996). Proinflammatorische Zytokine können dabei in orbitalen Fibroblasten inflammatorische Cyclooxygenasen induzieren, was einerseits zur Generierung von PGE₂ und cAMP führt, sich andererseits jedoch auch durch Glukokortikoide hemmen ließ (Wang et al., 1996).

Verschiedene Stimulatoren dienten in der Vergangenheit zur Untersuchung des beschriebenen Signalwegs. Im Mittelpunkt steht die Stimulation mit 10 mU/ml „recombinant human thyroid-stimulating hormone“ (rhTSH), welche in Experimenten von van Zeijl et al. einen beachtlichen cAMP-Anstieg in 10 von 12 differenzierten

Kulturen induziert (van Zeijl et al., 2011). Dabei konnte in diesen zehn Kulturen ein Anstieg vom 1,3- bis 7,8-fachen der Ausgangskonzentration verzeichnet werden (van Zeijl et al., 2011). Dem gegenüber konnte in einer vorherigen Arbeit, in welcher undifferenzierte Fibroblasten stimuliert wurden, nur ein mäßiger Effekt des rhTSH auf die cAMP-Produktion gemessen werden (van Zeijl et al., 2010). Beide Publikationen beschreiben ebenfalls die cAMP-Antwort auf die Stimulation isolierter Graves' Disease Immunglobuline (GD-IgG), wobei erneut nur 4 von 12 der differenzierten Kulturen zu einem signifikanten Anstieg des cAMPs führten (van Zeijl et al., 2010; van Zeijl et al., 2011). Die nicht zu vernachlässigende Rolle der differenzierten Kultur wird auch von Valyasevi et al. beschrieben, die einen signifikant höheren cAMP-Anstieg nach TSH-Stimulation ebenfalls nur in solchen Kulturen verzeichnen konnten (Valyasevi et al., 1999). Dies deckt sich wiederum mit der Beobachtung von van Zeijl, die von differenzierten OF-Kulturen höhere Level der TSHR-mRNA Expression sahen als von nicht differenzierten OF-Kulturen (van Zeijl et al., 2011). Auch Valyasevi et al. beschreiben kaum messbare cAMP-Quantitäten unter fehlender Stimulation, welche sich jedoch nach zweistündiger Inkubation mit 3×10^{-8} mol/l rhTSH, was dem tausendfachen Serumwert entspricht, deutlich erhöhen und bei 3×10^{-7} mol/l ihre höchsten Messwerte verzeichneten (Valyasevi et al., 1999). Dabei lagen die gemessenen cAMP-Werte in den differenzierten Kulturen 16- bis 63-fach höher, als sie es in den undifferenzierten Kulturen taten (Valyasevi et al., 1999). Es wird jedoch auch darauf hingewiesen, dass TSH nicht in jeder GOF-Kultur zu einer konstanten cAMP Produktion führt (Neumann et al., 2012).

Eine breite Anwendung findet der unspezifische Stimulator Forskolin, dem van Zeijl et al. eine signifikante Stimulation der cAMP-Produktion zuschreiben (van Zeijl et al., 2010). Dabei wurde eine 40-fache Induktion der cAMP-Produktion nach Stimulation mit 50µMol Forskolin in orbitalen Fibroblasten von drei Patienten erzielt (van Zeijl et al., 2010). Auch in der Stimulation von CHO-Zellen, welche den chimerischen MC4- oder Wildtyp-TSH-Rezeptor besitzen, lassen sich durch Forskolin dosisabhängig stimulieren, wobei die Konzentration des gemessenen cAMPs und der detektierten Luciferase positiv korrelierten (Diana et al., 2020). Dabei war das aus den Wildtyp-Zellen gemessene Signal 16-fach höher als das Signal der MC4-Zellen (Diana et al., 2020). Die Effekte des Forskolins wurden auch von Reddy et. al. untersucht, die unter Beigabe von 20 µM Forskolin ins Kulturmedium nach 30 Minuten morphologische Veränderungen der Fibroblasten in Form eines Resistenzverlustes der

Monolayerschicht feststellen konnten (Reddy et al., 1998). Dieser Resistenzverlust konnte auch unter der Beigabe von 1 μ Mol Prostaglandin E2 oder 4 μ Mol cAMP von selbigen Autoren beobachtet werden. (Reddy et al., 1998). Während einer Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen können GOF große Mengen an PGE2 generieren, morphologische Veränderungen konnte man hier nach 3,5 Stunden ebenfalls feststellen (Reddy et al., 1998). In Fibroblasten der Haut hingegen konnte weder unter Forskolin-, noch unter PGE2- oder Zytokine-Stimulation eine vergleichbare Beobachtung gemacht werden (Reddy et al., 1998). Dem gegenüber wurde jedoch gezeigt, dass die Aktivierung des Prostaglandin D2 Rezeptors durch BW245C, die cAMP-Konzentration in orbitalen Fibroblasten erhöhen kann (Guo et al., 2010). IL-1 β , dem bei der Stimulation der HA-Synthese eine große Rolle zugeschrieben wird (siehe unten), spielt bei der cAMP-Produktion mutmaßlich eine untergeordnete Rolle. Unter 10 ng/ml IL-1 β konnte lediglich ein zweifacher Anstieg des cAMP gemessen werden (van Zeijl et al., 2010).

Neben Forskolin spielt der TSH-Rezeptor stimulierende monoklonale Antikörper M22 eine wichtige Rolle in den verschiedenen Stimulationsversuchen. Durch Inkubation mit einer M22-Verdünnungsreihe (0,006 bis 50 ng/ml) konnte in Wildtyp- in MC4-CHO-Zellen sowie im Luciferase-Bioassay eine Dosis-Wirkungskurve erstellt werden (Diana et al., 2020). In der gleichen Publikation wird die hohe Korrelation zwischen cAMP-Assay und Luciferase-Assay beschrieben, welche vor allem in den MC4-Zellen deutlich wird (Diana et al., 2020). M22 nimmt in vielen weiteren Publikationen eine zentrale Rolle ein, worauf in den nachfolgenden Absätzen eingegangen wird.

Um den cAMP-Signalweg zu aktivieren, kann auch Serum von Patient*innen mit unbehandelten Hyperthyreodismus in verschiedenen Zelllinien eingesetzt werden. Die Effekte zahlreicher Serumproben wurden dabei von Diana et al. untersucht, welche erneut eine positive Korrelation zwischen cAMP-Anstieg und dem Luciferase-Bioassay feststellen konnten (Diana et al., 2020).

Im Vergleich zu Fibroblasten ist die mRNA des TSH-Rezeptors in Adipozyten zehnfach höher exprimiert, was ggf. den häufigeren Nachweis von cAMP nach TSH-Stimulation in Adipozyten erklärt (Neumann et al., 2012). Dieses Ergebnis wird durch den TSH-Gen Expressionsvergleich gestützt, welcher orbitales Gewebe von Patient*innen mit Endokriner Orbitopathie mit Gewebe von Patient*innen ohne

Erkrankung und mit abdominalen Gewebeproben vergleicht (Valyasevi et al., 1999). Um die Zellen in Adipozyten zu differenzieren, wurden konfluente Kulturen für weitere 10-14 Tage in Medium inkubiert, welches zusätzlich mit Indomethacin, Dexamethason, IBMX und Insulin versetzt war (Neumann et al., 2012). In Fibroblasten konnte man jedoch höhere Basalwerte des cAMPs und auch eine stärkere Stimulation durch Forskolin beobachten, was mit einem robusterem cAMP-generierenden System der GOF-Kulturen erklärt wird (Neumann et al., 2012). Da die unterschiedlichen GOF-Kulturen nach TSH-Stimulation nicht konstant mit einer cAMP-Produktion reagierten, entschieden sich die Autoren gepoolte GOF-Kulturen zu verwenden, um die Variabilität der cAMP-Produktion zu minimieren (Neumann et al., 2012).

Gegenstand jüngerer Publikationen sind Inhibitionsversuche mittels mikro- oder nanomolaren Antagonisten. In HEK-293 Zellen konnten Marcinkowski et. al. mittels dem Compound S37a, ein mikromolarer Antagonist der Thyrotropin induzierten cAMP-Akkumulation, die TSH-, KSA₁ und M22-induzierte Stimulation mit ähnlicher Potenz hemmen (Marcinkowski et al., 2019). Die inhibitorischen Effekte von S37a konnten auch nach Stimulation von Serum, welches aus Patient*innen mit Endokriner Orbitopathie isoliert wurde, nachgewiesen werden (Marcinkowski et al., 2019). Darüber hinaus ergaben toxikologische Untersuchungen mit Konzentrationen von 10-100 µMol S37a, dass weder in vitro, noch in vivo (Maus) die Zellviabilität geschädigt wird und die Bioverfügbarkeit 53% beträgt (Marcinkowski et al., 2019).

Dass eine nanomolare Konzentration von Org-274179-0 die TSH- und TSI-vermittelte Rezeptoraktivierung in CHO-Zellen hemmt, konnte von van Koppen et. al. beschrieben werden (van Koppen et al., 2012). Dabei hat Org-274179-0 keinen Effekt auf die Bindungsaffinität von TSH, somit wird vor allem das vom TSH-Rezeptor ausgehende Signal gehemmt und eben nicht die Aktivierung des TSH-Rezeptors selbst (van Koppen et al., 2012). Außerdem reduziert die Substanz die erhöhte basale Aktivität aller konstitutiven Varianten des TSH-Rezeptors und ihre antagonistische Potenz lässt sich nur marginal durch steigende TSH- und M22-Konzentrationen verringern (van Koppen et al., 2012).

Die Substanz Org-274179-0 wurde auch von van Zeijl et. al. zur Inkubation verwendet. Zum einen bestätigen die Ergebnisse die Resultate von van Koppen et al., da auch in dieser Arbeit erfolgreich die rhTSH- und M22-vermittelte cAMP-Antwort in CHO-Zellen

inhibiert werden konnte (van Zeijl et al., 2012). Zum anderen konnte die rhTSH-, M22- und GD-IgG-induzierte cAMP-Produktion in differenzierten GOF-Kulturen suppressiert werden (van Zeijl et al., 2012). In Abwesenheit von Org-274179-0, sorgte die Stimulation mit GD-IgG [1 mg/ml] für einen zweifachen cAMP-Anstieg (van Zeijl et al., 2012). Beschrieben wird eine dosisabhängige Inhibition der M22-induzierten cAMP-Antwort durch Org-274179-0, wobei sich keine Effekte auf TSH-Rezeptor-abhängige Stimulation durch Forskolin zeigten (van Zeijl et al., 2012).

Eine weitere Möglichkeit bietet die Inhibition mit dem TSHR-Antagonisten NCGC00229600, der ebenfalls die TSH- und M22-assoziierte Stimulation von cAMP in orbitalen Fibroblasten reduzieren kann (Neumann et al., 2012). Dabei hat NCGC00229600 keinen Effekt auf die basale cAMP-Produktion oder die BW245C-Stimulation hat und auch die TSH-vermittelte Stimulation in Adipozyten oder humanen Thyreozyten antagonisieren kann (Neumann et al., 2012).

2.6.1.2. Vergleich wesentlicher Variablen in der cAMP-Bestimmung

Da sich der Versuchsaufbau bei den Stimulationsversuchen der verschiedenen Arbeitsgruppen oft unterscheidet, erhält der Leser in der folgenden Tabelle eine Übersicht über zu berücksichtigende Variablen. Ein Vergleich der Anzahl der eingesetzten GOF-Kulturen/Patient*innen ist schwierig, da in den Publikationen oft mehrere Fragestellungen aufgeführt werden, welche wiederum mit einer unterschiedlichen Anzahl an Kulturen beantwortet wird. Die Anzahl der eingesetzten Fibroblasten (Zellzahl) wurde in den Publikationen häufig nicht angegeben, sodass ein Vergleich dieser Variablen ebenfalls nur schwer möglich ist. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass die Kultivierung der Fibroblasten sowie die Vorbereitung auf das jeweilige Assay je nach Autoren unterschiedlichen Protokollen folgt. Die Tabelle verdeutlicht, dass ein Vergleich erhobener Messdaten oft nur bedingt möglich ist.

| | Herkunft bzw. Art der Zellen | IBMX-Vorinkubation | Stimulationszeit | Stimulierende Substanzen | Art der Messung | Messung des cAMP's |
|-------------------------------|------------------------------|--------------------|------------------|----------------------------------|-----------------|------------------------|
| Valyasevi et al., 1999 | Orbita-Fettgewebe | 1 mMol/l für 2h | 1h und 2h | rhTSH (3x10 ⁻⁷ Mol/l) | Überstand | R&D System Minneapolis |

| | Herkunft bzw. Art der Zellen | IBMX-Vorinkubation | Stimulationszeit | Stimulierende Substanzen | Art der Messung | Messung des cAMP's |
|----------------------------------|--|--|------------------|--|-----------------|---|
| Kleinau et al., 2010 | HEK-293 | 0,25 mMol (zeitgleich zur Stimulation) | 1h | bTSH (1 µIU/ml bis 0,1 IU/ml) | Zelllysate | Antikörperbindung und Bestimmung mittels Gamma-zähler |
| van Zeijl et al., 2010 | Orbita-Fettgewebe | 0,5 nMol für 30 Minuten | 6h | GD-IgG (1 mg/ml), rhTSH (1 mU/ml), IL-1β (10 ng/ml), Forskolin (50 µMol) | Überstand | Alpha-Screen Perkin Elmer |
| van Koppen et al., 2012 | CHO-Zellen (humaner TSHR) FRTL-5-Zellen (TSHR der Ratte) | - | 1h | rhTSH, M22 | Zelllysate | Alpha-Screen Perkin Elmer |
| van Zeijl et al., 2012 | CHO-hTSHR | 0,5 nMol für 30 Minuten | 1h | rhTSH (10 nU/ml), GD-IgG (500 ng/ml), M22 (500 ng/ml) | Überstand | Alpha-Screen Perkin Elmer |
| Marcinkowski et al., 2019 | HEK-293T-Zellen | 0,25 mMol (zeitgleich zur Stimulation) | 1h | bTSH, rhFSH, M22, KSAb1, Serum 1:10 | Zelllysate | - |
| Diana et al., 2020 | CHO-Wildtyp CHO-MC4 | 100 µL | 3h (Forskolin) | Forskolin, M22, bTSH, | Überstand | Bridge-It cAMP designer |

| | Herkunft bzw. Art der Zellen | IBMX- Vorin- kubation | Stimula- tionszeit | Stimulier- ende Substanzen | Art der Messung | Messung des cAMP's |
|--|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------|-----------------------|
| | | | 30 Minuten (M22) | Serum 1:11 | | fluorescence assay |

Tab. 1: Vergleich wesentlicher Variablen in der Durchführung der cAMP-Messung.

2.6.2.1. Hyaluronsäure und die humorale Immunität

Schon früh fiel das vermehrte Auftreten sulfatierter und nicht sulfatierter Glykosamioglykane (GAG) im retrobulbären Interstitium auf, wobei es sich hierbei vor allem um HA handelt. Zudem konnten signifikant höhere Werte an HA-Antikörpern, die mit zunehmender Erkrankungsschwere anstiegen, in Patient*innen mit Endokriner Orbitopathie, als in Kontrollpatient*innen gemessen werden (Liebschner et. al., 1992; Kahaly et al., 1993). In mit Steroiden behandelten Patient*innen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Kahaly et al., 1993). Dem Geschlecht konnte ebenfalls kein Einfluss bzgl. Antikörperspiegel zugeschrieben werden, wohingegen Patient*innen unter 50 im Vergleich zu älteren Patient*innen höhere Antikörperspiegel trugen und eine erhöhte Bindungsfähigkeit den Antikörpern jenen Patient*innen zugeschrieben wird, welche unter der Erkrankung noch nicht länger als ein Jahr litten (Liebschner et. al., 1992; Kahaly et al., 1993). Mit antithyroidalen Behandlungen konnten Kahaly et. al. keinen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit der HA-Antikörper erzielen (Kahaly et al., 1993). Jedoch konnten unter immunsuppressiver Therapie (Corticosteroide bzw. Bestrahlung) niedrigere Antikörper-Spiegel erzielt werden (Liebschner et. al., 1992). Über die Messung der synthetisierten HA bietet sich somit eine weitere Möglichkeit die immunpathologische Aktivität orbitaler Fibroblasten in vitro zu erfassen. Dabei führt eine Co-Kultivierung mit Lymphozyten der EO-Patient*innen ebenfalls zu einem Anstieg der HA-Konzentration (Kahaly et al., 1992). Vergleicht man verschiedene Stimulationszeiten, so fallen nach 48 Stunden 2-3-fach höhere Werte als nach 24 Stunden auf (Kahaly et al., 1992).

Deshalb entschieden sich Beck et al. den Einfluss von Serum und IgG von 22 Patienten mit florider EO auf die GAG-Synthese zu untersuchen. Dabei wurde nach 24- und 48-stündiger Serum Inkubation eine erhöhte GAG-Sekretion beobachtet, wobei die Differenzierung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe über eine Stimulation mit Immunglobulinen in 48-stündiger Inkubation besser gelang (Beck et al., 1992). Die erhöhte GAG Sekretion nach Serum-Stimulation fand sich sowohl in der Patienten-, als auch Kontrollgruppe (Beck et al., 1992).

Die Fähigkeit von aus Patientenserum isolierten GD-IgGs eine HA-Synthese zu bewirken, wurde von Smith und Hoa beschrieben, denen es ebenfalls gelang, diesen stimulierenden Effekt mit IGF-1, nicht jedoch mit TSH zu reproduzieren (Smith and

Hoa, 2004). Dabei reagierten die Kulturen von Gewebespendern ohne Endokrine Orbitopathie nicht auf GD-IgGs oder IGF-1 (Smith and Hoa, 2004). Diese Befunde decken sich mit früheren Beobachtungen von GD-IgG und IGF-1 bzgl. der IL-16 und RANTES Expression in Fibroblasten (Pritchard et al., 2003). Jedoch konnten van Zeijl et al. in einer 48-stündigen Stimulation [1 mg/ml GD-IgG] zunächst keinen Effekt auf die HA-Synthese (van Zeijl et al., 2010), später aber eine beachtliche HA-Antwort in vier von fünf differenzierten Kulturen sehen (van Zeijl et al., 2011).

Neben Serum oder isolierten Immunglobulinen, bietet Forskolin eine weitere Option für eine Stimulation der Hyaluronsäure, was eine Aktivitätsbestimmung orbitaler Fibroblasten ermöglicht. So haben beispielsweise van Zeijl et al. den Einfluss des unspezifischen Stimulators Forskolin auf die HAS Expression untersucht (van Zeijl et al., 2010). Neben der gesteigerten Expression der HAS1 sowie der HAS3 konnte nach 48h auch eine um das 2,5-fach gesteigerte Sekretion von HA gemessen werden (van Zeijl et al., 2010). Später wurden diese Ergebnisse in differenzierten Fibroblasten bestätigt (van Zeijl et al., 2011).

Die Auswirkungen von rhTSH auf die Synthese von Hyaluronsäure wurden ebenfalls von van Zeijl et al. untersucht. Ob rhTSH die HAS1 mRNA-Expression induziert konnte aufgrund heterogener Ergebnisse nicht geklärt werden, zumal die HA-Synthese in lediglich in einer von sieben Kulturen gesteigert werden konnte (van Zeijl et al., 2011). Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus einer vorherigen Publikation, welche die fehlende HA-Stimulation von 10mU/ml rhTSH auf orbitale Fibroblasten in ähnlicher Form beschreibt (van Zeijl et al., 2010). Des Weiteren wurde eine synergistische Hochregulation der HA-Synthese unter kombinierter Inkubation von TSH und IGF-1 beschrieben (Krieger et al., 2015).

Um einen spezifischen Stimulator hingegen handelt es sich bei dem monoklonalen TSH-Rezeptor Antikörper M22, welcher die Effekte von GD-IgGs modelliert. Durch seine TSH-Rezeptor-Aktivierung konnten Krieger und Gershengorn einen wesentlich höheren Anstieg der HA-Produktion in differenzierten orbitalen Fibroblasten, als in anderen Fibroblasten messen (Krieger and Gershengorn, 2014). Dabei konnten mit einer TSH-Stimulation nur 50% der HA-Konzentrationen erreicht werden, welche mit einer M22 Inkubation erzielt werden konnten (Krieger and Gershengorn, 2014). Die Effekte von M22 und TSH konnten mit einem TSH-Rezeptorantagonisten komplett

verhindert werden, was somit nicht für das Vorliegen eines anderen Rezeptors als Ziel von M22 spricht (Krieger and Gershengorn, 2014). Darüber hinaus konnten Krieger et al. eine biphasische Dosis-Response des monoklonalen Antikörpers M22 feststellen und eine Inhibition der hochpotenten Phase mittels IGF-1-Rezeptor Antagonisten beschreiben (Krieger et al., 2015). Inhibitorische Eigenschaften von IGF-1-Rezeptor Antikörpern wurden auch von Place et al. und Krieger et al. beobachtet (Place et al., 2017; Krieger et al., 2016). Beide Phasen der M22 bedingten HA-Sekretion können dagegen mit TSHR-Antagonisten eingedämmt werden (Krieger et al., 2015). Somit scheint die M22-abhängige Stimulation der HA vom TSH-Rezeptor sowie vom IGF-1-Rezeptor vermittelt zu werden (Krieger et al., 2015). Dieser sogenannte Crosstalk wird im Folgenden noch beschrieben.

Weitere Erkenntnisse konnten unter Verwendung von IL-1 β gewonnen werden. Unter Stimulation kommt es zu einer Induktion der HAS Expression aller drei Isoformen und folglich zur HA-Sekretion (van Zeijl et al., 2010). Auch Kaback und Smith konnten eine Vervielfachung der HA-Synthese orbitaler Fibroblasten feststellen, nachdem sie 24h mit 10ng/ml stimulierten (Kaback and Smith, 1999). Durchschnittlich 6,7-fach höhere HA-Werte im Medium fanden Krieger und Gershengorn nach 10-tägiger IL-1 β Behandlung (Krieger and Gershengorn, 2014).

Die Eigenschaften von „Platelet-derived growth factor“ (PDGF), werden von van Steensel beschrieben. Demnach sind die Subtypen PDGF-AB und PDGF-BB in der Lage, die TSHR Expression orbitaler Fibroblasten zu erhöhen, wobei das präinkubierte PDGF-BB auch die Signalantwort bzgl. IL-6, IL-8, CCL2 und Hyaluronsäure erweitert (van Steensel et al., 2012).

Um ein vollständigeres Verständnis der molekularen Prozesse zu generieren, wurde der sogenannte „Crosstalk“ zwischen dem TSHR und dem IGF1R vielfach untersucht (siehe Abb. 4), da die daraus resultierende synergistische Stimulation der HA-Sekretion eine bedeutende Komponente der Pathologie der Endokrinen Orbitopathie darstellt (Krieger et al., 2019). Die funktionellen Interaktionen zwischen dem TSHR und IGF1R wurden in orbitalen Fibroblasten von zahlreichen Arbeitsgruppen nachgewiesen (Tsui et al., 2008; Hoa et al., 2012; Chen et al., 2014). Die Hypothese des TSH/IGF1 Rezeptor-Crosstalk wird insbesondere durch die Ergebnisse von Chen et al. bestärkt, welche durch blockierende IGF1R-Antikörper und Linsitinib, einem

IGF1R-Antagonisten, die Hemmung der TSH-abhängigen Hyaluronsäurestimulation belegen konnten (Chen et al., 2014). Die Dosis-Wirkungskurve vom stimulierenden Antikörper M22 konnte in diesem Zusammenhang als biphasisch beschrieben werden, wobei Linsitinib nur die Phase der höheren Potenz (geringere M22 Konzentration) hemmen konnte (Krieger et al., 2016).

Die G-Protein regulierenden Proteine β -arrestin 1 und β -arrestin 2 erweisen sich dabei als Schlüsselemente in der Regulation der TSHR-vermittelten Signaltransduktion (Kopp, 1997), wobei β -arrestin 2 eine dominante Rolle in der TSHR-Desensibilisierung spielt (Frenzel, Voigt and Paschke, 2006; Boutin et al., 2014). Dabei konnten Stimulationsversuche in GOF-Kulturen sowie Zelllinien zeigen, dass isolierte Immunglobuline die nachgeschalteten Pathways (pERK1/2 und pAKT) des beschriebenen Crosstalks aktivieren, jedoch waren Immunglobuline nicht dazu in der Lage, eine direkte Aktivierung des IGF1R zu bewirken (Marcus-Samuels et al., 2018).

Bereits in den Publikationen von Smith und Hoa oder Kaback und Smith konnte durch Beigabe von Dexamethason ein dämpfender Effekt der HA-Synthese sowie der HAS mRNA Induktion ermittelt werden (Smith and Hoa, 2004; Kaback and Smith, 1999). Heute rücken in Inhibitionsversuchen jedoch vor allem blockierende Antikörper wie bspw. K1-70, AF305 oder 1H7 und LMW-Antagonisten wie ANTAG3 oder Linsitinib in den Vordergrund. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass ANTAG3 und Linsitinib die M22-vermittelte TSH-Rezeptor-Aktivierung und somit die HA-Sekretion orbitaler Fibroblasten inhibieren (Place et al., 2017). Dabei konnte ANTAG3 in hoher Konzentration auch die Maximaldosis der M22-Stimulation unterbinden, wohingegen Linsitinib selbst in hoher Konzentration die Effekte der steigenden M22-Konzentration nicht vollständig blockieren konnte (Place et al., 2017). Die Inhibition des IGF-1-Rezeptors durch die blockierenden Antikörper gelingt im Falle einer IGF-1-vermittelten Stimulation den Antikörpern 1H7 und AF305, in der M22-vermittelten Stimulation jedoch nur dem Antikörper 1H7 (Place et al., 2017).

Folglich bietet die Literatur zahllose Hinweise auf die unverwechselbare histopathologische Eigenschaft der fehlerhaften Akkumulation des Glykosaminoglykans HA. Diese Vergesellschaftung erfolgt meist im Kontext mit Entzündungsvorgängen sowie Gewebe-Remodeling.

Neben der cAMP- und HA-Bestimmung ist das Verfahren der Viabilitätsmessung mittels MTT-Assay etabliert. So konnten z.B. Hansen et al. nach 72 Stunden eine max. Aktivität von Adipozyten nach Serum- und IgG-Stimulation feststellen (Hansen et al., 1993).

2.6.2.2. Vergleich wesentlicher Variablen in der HA-Bestimmung

Die folgende Tabelle vergleicht wesentliche Unterschiede im Versuchsaufbau der Hyaluronsäure-Messungen verschiedener Arbeitsgruppen, welche sich mit verwandten Fragestellungen beschäftigt haben. Ein Vergleich der Anzahl der eingesetzten GOF-Kulturen/Patient*innen ist erneut (siehe cAMP-Assay) schwierig, da in den Publikationen oft mehrere Fragestellungen aufgeführt werden, welche wiederum mit einer unterschiedlichen Anzahl an Kulturen beantwortet werden. Die Anzahl der eingesetzten Fibroblasten (Zellzahl) wurde in den Publikationen häufig nicht angegeben, sodass ein Vergleich dieser Variable ebenfalls nur schwer möglich ist. Auch hier ist zu berücksichtigen, dass die Kultivierung der Fibroblasten sowie die Vorbereitung auf das jeweilige Assay, je nach Autoren unterschiedlichen Protokollen folgt.

| | Herkunft bzw. Art der Zellen | Stimulierende Substanzen | Stimulationszeit | Messung der Hyaluronsäure |
|-------------------------------|-------------------------------------|--|-------------------------|----------------------------------|
| Kaback and Smith, 1999 | Orbita-Fettgewebe | IL-1 β (10 ng/ml) | 24h | keine Angabe |
| Smith and Hoa, 2004 | Orbita-Fettgewebe | IGF-1 (10 nMol/l), aus Serum isolierte GD-IgG (100 ng/ml) | 24-72h | ELISA-Kit von Echelon Bioscience |
| van Zeijl et al., 2010 | Orbita-Fettgewebe | rhTSH (10 mU/ml), GD-IgG (1 mg/ml), Forskolin (50 μ M), IL-1 β (10 ng/ml) | 48h | ELISA-Kit von Echelon Bioscience |

| | Herkunft bzw. Art der Zellen | Stimulierende Substanzen | Stimulationszeit | Messung der Hyaluronsäure |
|--------------------------------------|-------------------------------------|--|-------------------------|----------------------------------|
| van Zeijl et al., 2011 | Orbita-Fettgewebe | IL-1 β (10 ng/ml), Forskolin (50 μ M), rhTSH (10 mU/ml), c-IgG, GD-IgG | 48h | ELISA-Kit von Echelon Bioscience |
| van Steensel et al., 2012 | Orbita-Fettgewebe | bovines TSH (5 und 10 mU/ml), GD-IgG, Sjs-IgG, h-IgG (alle 20 ng/ml) | 24h | HA-ELISA von R&D Systems |
| Krieger and Gershengorn, 2014 | Orbita-Fettgewebe | M22 (100 ng/ml), bovines TSH (100 mU/ml) | 96h | HA-ELISA von Corgenix |
| Krieger et al., 2015 | Retroorbitales Fettgewebe | TSH, IGF-1, M22 | 120h | HA-ELISA von Corgenix |
| Krieger et al., 2016 | Orbita-Fettgewebe | M22, IGF-1, aus Serum isolierte GD-IgG | 120h | HA-ELISA von Corgenix |
| Place et al., 2017 | Retroorbitales Fettgewebe | M22 | - | HA-ELISA von Corgenix |
| Krieger et al., 2019 | Orbita-Fettgewebe | M22 (verschiedene Dosen), GO-Ig 1:4 in DMEM, KSAb1 | 72h | HA-ELISA von Corgenix |

Tab. 2: Vergleich wesentlicher Variablen in der Durchführung der HA-Messung.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Instrumente im Zellkulturlabor (alphabetisch)

| | |
|--|---|
| Abwurfbehälter Sharpsafe | P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln |
| CoolCell Box | Biocision, California USA |
| Digitaler Pipettierhelfer 0,1-100 ml | Sunlab, Mannheim |
| Einmalskalpelle (steril) | Feather, Osaka Japan |
| Eppendorf Reaktionsgefäß | Greiner bio-one International GmbH Kremsmünster Österreich |
| Falcon 15 ml „BLUE MAX Jr.“ | Beckton Dickinson Labware, New Jersey USA |
| Falcon 50 ml „CELLSTAR“ | Greiner bio-one International GmbH Kremsmünster Österreich |
| Filterpipettenspitzen 10 µl „TipOne“ | STARLAB International GmbH, Hamburg |
| Filterpipettenspitzen 1000 µl „TipOne“ | STARLAB International GmbH, Hamburg |
| Kryoröhrchen, 2 ml | Brand GmbH + Co KG Wertheim |
| Pasteurpipetten Varicon RK | Schuett-biotech GmbH, Göttingen |
| Petrischale 10 cm | Greiner bio-one International GmbH Kremsmünster Österreich |
| Pinzetten (autoklaviert) | Aesculap AG, Tuttlingen |
| Pipetten verschiedener Volumina | Eppendorf Research plus, Hamburg |
| Serologische Pipette 10 ml „CELLSTAR“ | Greiner bio-one International GmbH Kremsmünster Österreich |
| Styropor Transportbox | Schaumaplast GmbH & Co. KG Reilingen |
| Whatman Filterpapier | Tisch Scientific, Cleves USA |
| 6-Well-Platte | Orange Scientific, Braine-l'Alleud Belgien |
| 24-Well-Platte | Orange Scientific, Braine-l'Alleud Belgien |
| 96-Well-Platte | Corning Inc., New York USA |

3.1.2. Geräte im Zellkulturlabor (alphabetisch)

| | |
|--|---|
| Automatisches Zellzählgerät Luna fl Dual Fluorescence Cell Counter | Logos Biosystems, South Korea |
| Einweg-Zählkammer für Zellzählgerät PhontonSlide Ultra-low Fluorescence Counting Slide | Logos Biosystems, South Korea |
| Feinstwaage Sartorius Handy H110 | Sartorius AG, Göttingen |
| Flüssigstickstofftank | AIR LIQUIDE Kryotechnik GmbH, Düsseldorf |
| Inkubator 37°C, 5% CO ₂ HERAcell 240i CO ₂ Incubator | Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts USA |
| Lichtmikroskop Primo Vert | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena |
| Mikroskopkamera AxioCam ERc 5s | Carl Zeiss AG, Oberkochen |
| Mikrotiterplatten-Schüttler PMS-1000i | Grant Instruments LTD., Cambridge UK |
| Neubauerkammer | Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen |
| Photometer | Eppendorf, Hamburg |
| SANOclav | Maschinenbau Wolf GmbH, Bad Überkingen |
| Sterilbank BSB 4A | Gelaire, Sydney Australien |
| Tecan Infinite M200 Absorptionsreader | Tecan Trading AG, Schweiz |
| Vakuumpumpe AF 204 | HLC Biotech, Bovenden |
| Waage | Sartorius AG, Göttingen |
| Wasserbad | Köttermann GmbH, Uetze |
| Zentrifuge „Heraeus Biofuge Primo R“ | Thermo Electron Corp., Massachusetts USA |

3.1.3. Gewebeproben zur Zellkultivierung

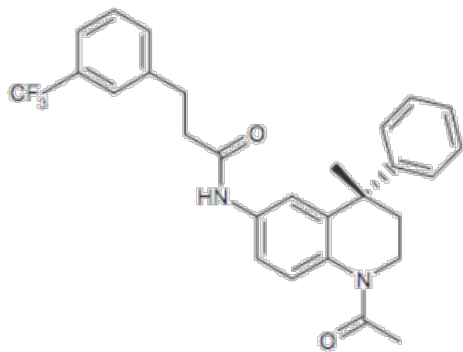
Das Molekulare Schilddrüsenlabor von Prof. Dr. G. J. Kahaly kollaboriert mit der Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz. In der wöchentlichen Orbita-Sprechstunde werden Patienten, deren endokrinologische Grunderkrankung sich durch eine Augenbeteiligung kennzeichnet, einem interdisziplinären Team vorgestellt. Das Operationsspektrum des universitären Zentrums ist breit, sodass neben der Dekompression bei Endokriner Orbitopathie, auch zahlreiche weitere Eingriffe durchgeführt werden, deren Gewebeproben uns als Kontrollgewebe dienen. Von allen Patient*innen wurde vor dem Procedere eine Einverständniserklärung schriftlich unterzeichnet.

3.1.4. Verwendete Reagenzien (alphabetisch)

| | |
|---|--|
| Acridinorange/Propidiumjodid | Biozym Scientific GmbH, Oldendorf |
| Destilliertes Wasser | Cayman Chemical Company, Michigan USA |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach |
| Ethanol absolut p.A. | AppliChem Panreac, Darmstadt |
| Ethanol 70% | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Formalin Lösung, neutral gepuffert, 10% | Sigma-Aldrich, Missouri USA |
| Isopropylalkohol 99% | Aug. Hedinger GmbH & Co., Stuttgart |
| Kollagenase Typ IV 1 g, 275 Units/mg | Gibco, Massachusetts USA |
| Recombinant Human Anti-TSHR Antibody M22 | RSR Limited, Cardiff UK |
| Org 274179-0 | Byondis, Nijmegen NL |
| Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) | Gibco, Massachusetts USA |
| Poly D-Lysin 1 mg/ml in H ₂ O | Sigma-Aldrich, Missouri USA |
| Stimulierender humaner monoklonaler TSH-Rezeptor Antikörper M22 Mak 40 µg | RSR Limited, Cardiff UK |
| SYD1890/4 (Compound A) | Byondis, Nijmegen NL |

| | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| SYD5515/2 (Compound D) | Byondis, Nijmegen NL |
| Thyretain Reaktionspuffer | Diagnostic Hybris, Inc., Ohio USA |
| Trypanblau 0,4% C.I. Direct blue | Logos Biosystems, South Korea |
| Trypsin/EDTA 0,05%/0,02% in PBS | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach |

6a



6b

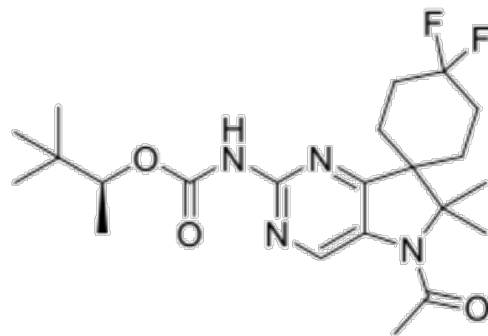


Abb. 6a und b: Chemische Struktur von Org 274179-0 (van Koppen et al., 2012) und SYD5115/2 (Byondis, Nijmegen, NL).

3.1.5. Verwendete Assays und Test-Kits (alphabetisch)

| | |
|---|--|
| cAMP-Screen System Chemiluminescent Immunoassay | Applied Biosystems, Massachusetts, USA |
| Hyaluronsäure Sandwich ELISA | Echelon Biosciences, Salt Lake City, USA |
| Melon Gel IgG Spin Purification Kit | Thermo Scientific, Illinois, USA |
| Mykoplasmen Nachweistest MycobBlue Mycoplasma Detector | Vazyme biotech Co., Ltd., Nanjing, China |
| MTT Assay Kit | Abcam, Cambridge, UK |

3.1.6. Verwendete Medien zur Zellkultur (nach Volumina)

3.1.6.1. F-Medium (500 ml)

| | |
|---|--|
| Advanced Dulbecco`s modified Eagle Medium (DMEM) / F12; 250 ml | Gibco, Massachusetts, USA |
| Dulbecco`s modified Eagle Medium (DMEM); 188,15 ml | Gibco, Massachusetts, USA |
| Fetales Bovines Serum; 50 ml | Gibco, Massachusetts, USA |
| Penicillin/Streptomycin; 5 ml | Gibco, Massachusetts, USA |
| L-Glutamin 200 mMol; 5 ml | Gibco, Massachusetts, USA |
| Hydrocortison 0,5 mg/ml in 100% Ethanol | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |
| Rekombinanter humaner epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) → 1 ml Hydrocortisonlösung + 2,5 µl EGF-Lösung in 19 ml DMEM; 0,5 ml | PeptoTech, New Jersey, USA |
| Y-27632 Dihydrochlorid 10 mg; 0,5 ml | Tocris Bioscience, Bristol, UK |
| Fungizone/Amphotericin B 250 µg/ml; 0,5 ml | Thermo Fisher Scientific, New Hampshire, USA |
| Insulin Lösung 10 mg/ml; 0,25 ml | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |
| Gentamycin 50 mg/ml; 0,1 ml | Gibco, Massachusetts, USA |
| Cholera Toxin 0,5 mg; 4,5 µl | Sigma-Aldrich, Missouri, USA |

3.1.6.2. Wachstumsmedium (500 ml)

| | |
|---|---------------------------|
| Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM); 445 ml | Gibco, Massachusetts, USA |
| Fetales Bovines Serum; 50 ml | Gibco, Massachusetts, USA |
| Penicillin/Streptomycin; 5 ml | Gibco, Massachusetts, USA |

3.1.6.3. Einfriermedium (50 ml)

| | |
|-------------------------------|-----------------------------|
| Fetales Bovines Serum; 45 ml | Gibco, Massachusetts, USA |
| Dimethylsulfoxid (DMSO); 5 ml | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach |

3.2. Methoden¹

3.2.1. In Vitro Kultivierung orbitaler Fibroblasten

3.2.1.1. Klassischer Weg - Von der Gewebeentnahme zur Zellkultur

3.2.1.1.1. Entnahme und Transport der Gewebeproben

Dank hervorragender Kooperation mit der Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz konnte ein schneller und effizienter Algorithmus des Gewebetransports etabliert werden. Wöchentlich wurden ausreichend 50 ml Falcons, gefüllt mit 25 ml PBS, in einem 5°C Kühlschrank des OP-Bereiches der hiesigen Augenklinik gelagert. Schon während der Gewebegewinnung wurde unser Labor telefonisch benachrichtigt, sodass ein umgehender Transfer ermöglicht wurde. Dieser Transfer wurde in einer mit Eis gefüllten Styroporbox durchgeführt. Die Kühlkette wurde zu keinem Zeitpunkt unterbrochen. Durch aseptische Arbeitsweise in OP und Labor, den gekühlten Transport und die regelmäßige Erneuerung der Falcons ist eine Kontamination äußerst unwahrscheinlich.

3.2.1.1.2. Zellkultur Anlage

Nachdem das Gewebe in PBS und auf Eis gelagert im Labor eintrifft, wird die Probe registriert und umgehend verarbeitet. Die Arbeitsschritte, die das Anlegen einer Zellkultur erfordert, werden allesamt unter der Laminar Airflow Bench verrichtet. Alle Instrumente sind steril verpackt oder autoklaviert. Die Arbeitsschritte verteilen sich auf zwei Tage. Es sind mindestens 0,5-0,6 mg Orbitalgewebe zur Anlage einer Zellkultur erforderlich.

¹ Die Abläufe 3.2.1.1.1. bis 3.2.1.1.4. sowie 3.2.1.2.1. bis 3.2.1.2.2. folgen dem laborinternen SOP016 (Molekulares Schilddrüsenlabor Mainz – Prof. Dr. med. Kahaly).

Tag 1:

- Vorbereitung der Instrumentenspülung
 - Falcon 1: 20 ml Ethanol 70%
 - Falcon 2: 25 ml PBS
 - Falcon 3: 30 ml Wachstumsmedium
- Vorbereitung der Gewebespülung
 - Zwei Falcons mit 25 ml PBS
- Falcon mit Gewebeprobe aus Eis nehmen und mit Ethanol 70% desinfizieren
- Petrischale mit verschlüsselter Patientenummer und Datum beschriften
- Kollagenase IV im Wasserbad bei 37°C vorwärmen
- Pinzette jeweils kurz in Instrumentenspülung 1, 2 und 3 tauchen
- Mit Pinzette das Gewebe aus dem Transport-Falcon in Gewebespülung 1 transferieren
- Falcon der Gewebespülung 1 mit Gewebe kurz schwenken und Gewebe in Gewebespülung 2 transferieren
- Gewebe mit Pinzette auf Petrischale überführen
- Mit Pinzette und Skalpell das Gewebe in ca. 1x1 mm Stücke auftrennen und auf Petrischale verteilen
- 5 ml Kollagenase IV hinzugeben und 2 Stunden auf 37°C und 5% CO₂ inkubieren
- Nach der Inkubation wird die Kollagenase IV in ein 15 ml Falcon überführt und 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert
- Während des Zentrifugierens bereits 6 ml Wachstumsmedium auf Petrischale pipettieren
- Nach dem Zentrifugieren bilden sich im Falcon drei Phasen. Die oberste Phase (Fettgewebe) wird zurück auf die Petrischale transferiert, die flüssige Phase mithilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und das verbleibende Zellpellet wird in 1 ml Wachstumsmedium resuspendiert, ehe es ebenfalls zurück auf die Petrischale überführt wird.
- Inkubation der Petrischale über Nacht auf 37°C und 5% CO₂
- Die erstellte Kultur wird nun als Basisplatte bezeichnet

Tag 2:

- F-Medium im Wasserbad auf 37°C vorwärmen
- Wachstumsmedium der Petrischale in 15 ml Falcon überführen und 5 Minuten auf 2000 rpm zentrifugieren
- Während des Zentrifugierens 6 ml F-Medium auf Petrischale geben
- Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand im Falcon verworfen und das Zellpellet in 1 ml F-Medium resuspendiert
- Resuspendat auf Petrischale verteilen
- Erneute Lagerung im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂

3.2.1.1.4. Mediumwechsel

Zum Erhalt von Wachstum und Vitalität benötigen Zellkulturen orbitaler Fibroblasten einen regelmäßigen Wechsel des Kulturmediums. Zum einen metabolisieren die Zellen Bestandteile des Mediums, zum anderen zerfallen diese während der Inkubation auf 37°C mit Fortschreiten der Zeit. Des Weiteren fallen Stoffwechselprodukte wie z.B. Lactat oder Ammoniak an, die den pH-Wert verändern.

Vor dem Mediumwechsel sollte die Kultur makroskopisch sowie mikroskopisch auf Kontaminationen überprüft werden. Unter der mikroskopischen Kontrolle kann zudem das Wachstumsverhalten kontrolliert und mit Photographien dokumentiert werden. Der Mediumwechsel selbst erfolgt unter aseptischen Bedingungen unter der Laminar Airflow Bench.

Protokoll:

- F-Medium im Wasserbad bei 37°C vorwärmen
- autoklavierte Pasteurpipette auf Saugspitze des Vakuum-Saugers setzen
- altes Medium vorsichtig absaugen, dabei die Petrischale leicht anheben, sodass die Spitze der Pasteurpipette nur am äußersten Rand eingetaucht wird
- vorgewärmtes F-Medium vorsichtig über den Rand in Petrischale pipettieren

3.2.1.1.5. Subkultivierung

Die mikroskopische Beurteilung gibt Aufschluss über die erreichte Konfluenz der Zellkultur.

Unter Konfluenz stehen die Zellen in sehr engem Kontakt zueinander und die Petrischale bietet ihnen keine weitere Oberfläche, die ihnen als Substrat dienen kann. Man spricht hierbei auch von Kontaktinhibition. Die Proliferationsrate nimmt stark ab. Dies kann sogar zum Absterben der Zellkultur führen. Deshalb ist eine Überführung und Aufteilung der Kultur rechtzeitig durchzuführen. Man spricht hierbei vom Passagieren der Zellen.

Eine verbreitete Methode ist hierbei die Verwendung der alkalischen Pankreasprotease Trypsin, welche die Zell-Matrix-Verbindungen andaut und die Zellen von der Petrischale ablöst. Dieser Vorgang wird als Detachment bezeichnet. Trypsin darf nicht zu lange mit den Zellen in Kontakt bleiben, da die Viabilität irreversible Schäden nehmen kann.

Zudem muss auf ein vollständiges Ablösen der Zellen durch den Trypsinierungsprozess gewartet werden, da ansonsten Inseln nicht-trypsinierter Zellen zurückbleiben. Dies führt zu einer unerwünschten Selektion schlecht haftender Zellen.

Die Subkultivierung erfolgt unter aseptischen Bedingungen unter der Laminar Airflow Bench.

Protokoll:

- Beschriftung nachfolgender Petrischalen (verschlüsselte Pat.-Nr., Passage-Nr., Datum)
- Vorwärmen von PBS, Trypsin, Wachstumsmedium und F-Medium im Wasserbad (37°C)
- autoklavierte Pasteurpipette auf Saugspitze des Vakuumsaugers setzen
- altes Medium absaugen
- Petrischale mit 5 ml vorgewärmten PBS spülen und mehrfach vorsichtig schwenken
- PBS absaugen

- 3 ml vorgewärmtes Trypsin auftragen und 8,5 Minuten (Basisplatte) oder 3 Minuten (Passageplatte) bei 37°C und 5% CO₂ inkubieren
- nach Ablauf der Inkubation erfolgt mikroskopische Kontrolle des Detachments
- 5 ml Wachstumsmedium zu Trypsin in Petrischale pipettieren
- Das Gemisch aus Zellen, Trypsin und Wachstumsmedium in ein 15 ml Falcon überführen und 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugieren
- Falls eine Basisplatte trypsiniert wurde, wird diese erneut mit 7 ml F-Medium befüllt und fortlaufend inkubiert. Wenn eine bereits subkultivierte Platte trypsiniert wurde, kann diese verworfen werden
- Nach Zentrifugation kann der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Wachstumsmedium resuspendiert werden
- 6,5 ml F-Medium auf neue Platten vorlegen und je 0,5 ml des Resuspendats hinzugeben
- entstandene Subkultur auf 37°C und 5% CO₂ inkubieren
- erneuter Mediumwechsel nach sieben Tagen, erneute Aufteilung bei erreichter Konfluenz

3.2.1.1.6. Verlauf / Fotodokumentation

Nach Anlage einer Zellkultur wurde die gesamte Petrischale wöchentlich mikroskopisch inspiziert. Dies geschah mit dem Lichtmikroskop Primo Vert von Carl Zeiss Microscopy. Ein besonderer Fokus lag hierbei auf der Zellmorphologie und dem Voranschreiten des Zellwachstums. Subkultivierungen wurden engmaschigeren Kontrollen unterzogen.

Die Fotodokumentation wurde durch die Mikroskopkamera AxioCam ERc der Carl Zeiss AG und dem Programm Zen 3.1 blue, ermöglicht.

Protokoll:

- PC starten, Programm öffnen, Mikroskop einschalten
- gesamte Platte mikroskopisch inspizieren, verschiedene Objektive verwenden, um Morphologie zu beurteilen
- Foto schießen, „Bester Fit“ auswählen, Objektivgröße und Maßstabsbalken einfügen, speichern

3.2.1.1.7. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mithilfe des automatischen Zellzählgerät Luna fl Dual Fluorescence Counter der Firma Logos Biosystems aus Südkorea. Die trypsinisierten Zellen konnten nach Zentrifugation und Resuspendierung in F-Medium mit dem Farbstoff Acridinorange angefärbt und auf eine Photoslide aufgetragen werden. Im Menü des Gerätes wurde die Methode des Fluoreszenz-Counting gewählt und das Protokoll auf „Fibroblasten“ gestellt. Man misst Zählkammer A und anschließend Zählkammer B. Aus beiden Werten wird der Mittelwert gebildet.

Protokoll:

- Zellen von Kultur trypsinieren, zentrifugieren, Überstand absaugen (siehe Subkultivierung)
- Zellpellet in 1 ml F-Medium resuspendieren
- 18 µl des Zellgemisch mit 2 µl Acridinorange in einem Eppendorf-Gefäß mischen
- je 10 µl des nun angefärbten Zellgemisches in Zählkammer der Photoslide pipettieren
- Luna fl Dual Fluorescence Counter einschalten
- Methode Fluoreszenz-Counting wählen und Protokoll auf Fibroblasten setzen
- Kammer A und B messen, Mittelwert bilden

3.2.1.1.8. Aussäen in 96-Well-Platte

Nachdem die Zellen in Passage 2 ein konfluentes Wachstum erreicht hatten, wurden diese für die Stimulationsversuche in eine 96-Well-Platte ausgesät. Hierbei wurden in jedem Napf der Platte 10.000 Zellen pipettiert. Die designierte Zellzahl wurde wie oben beschrieben bestimmt.

Protokoll:

- Zellen von Kultur trypsinieren, zentrifugieren, Überstand absaugen (siehe Subkultivierung)
- Zellzahl bestimmen (siehe Zellzahlbestimmung)
- Berechnung des benötigten Resuspendatvolumens und des benötigten F-Mediums

- aus Resuspendat und F-Medium das erforderliche Gesamtvolumen herstellen und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren die Zellen im gesamten Medium verteilen
- je 100 µl des erstellten Gesamtvolumens in Napf der 96-Well-Platte pipettieren
- Inkubation der Kultur für vier Tage bei 37°C und 5% CO₂

3.2.1.2. Alternative/Optionale Zwischenschritte

3.2.1.2.1. Konservierung von Fettgewebe bei -80°C

Nach Eintreffen von Gewebeproben wird gemäß des aktuellen Bestands der inkubierten Zellkulturen entschieden, ob das gewonnene Gewebe in Kultur gebracht oder konserviert wird. Bei großen Mengen an gewonnenem Fettgewebe, kann ein Teil der Probe kultiviert, ein anderer Teil konserviert werden. Es sind mindestens 0,5-0,6 mg Orbitagewebe zur Anlage einer Zellkultur als auch zur Konservierung erforderlich. Alle Arbeitsschritte sind aseptisch unter der Laminar Airflow Bench zu verrichten.

Protokoll:

- Vorbereitung der Instrumentenspülung
 - Falcon 1: 20 ml Ethanol 70%
 - Falcon 2: 25 ml PBS
 - Falcon 3: 30 ml Wachstumsmedium
- Vorbereitung der Gewebespülung
 - Zwei Falcons mit 25 ml PBS
- Einfriermedium auftauen und im Wasserbad bei 37°C vorwärmen
- Falcon mit Gewebeprobe aus Eis nehmen und mit Ethanol 70% desinfizieren
- Cryo-Well mit verschlüsselter Patientenummer und Datum beschriften
- Pinzette jeweils kurz in Instrumentenspülung 1, 2 und 3 tauchen
- Mit Pinzette das Gewebe aus dem Transport-Falcon in Gewebespülung 1 transferieren
- Falcon der Gewebespülung 1 mit Gewebe kurz schwenken und Gewebe in Gewebespülung 2 transferieren
- Gewebe mit Pinzette auf Petrischale überführen
- mit Pinzette und Skalpell das Gewebe zerkleinern

- ca. 0,5-0,6 mg der zerkleinerten Gewebestücke in Cryo-Well überführen
- Cryowell bis zur 1,8 ml Markierung mit Einfriermedium befüllen
- Cryo-Well in CoolCell Box einsetzen und über Nacht im -80°C Gefrierschrank lagern
- am Folgetag kann das CryoWell ohne CoolCell Box in einem Styroporbehälter im -80°C gelagert werden
- Dokumentation der konservierten Gewebeprobe

3.2.1.2.2. Konservierung einer Subkultur bei -80°C

Gelegentlich können Kulturen in Passage 2 nicht direkt für ein anstehendes Assay in die nächste Passage überführt werden. Zeigen die Zellen morphologisch ein gutes Bild, so können diese einem Konservierungsprozess unterzogen werden. Es empfiehlt sich eine Fotodokumentation, mit der die Zell-Morphologie vor und nach der Konservierung festgehalten wird. Auch die Konservierung erfolgt aseptisch unter der Laminar Airflow Bench.

Protokoll:

- Zellen von Kultur trypsinieren, zentrifugieren, Überstand absaugen (siehe Subkultivierung)
- Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendieren
- Cryo-Well mit verschlüsselter Patienten- und Passagenummer sowie Datum beschriften
- Resuspendat in Cryo-Well pipettieren
- Cryo-Well bis zur 1,8 ml Skalierung mit Einfriermedium auffüllen
- Cryo-Well in CoolCell Box einsetzen und über Nacht im -80°C Gefrierschrank lagern
- am Folgetag kann das CryoWell ohne CoolCell Box in einem Styroporbehälter im -80°C gelagert werden
- Dokumentation der konservierten Subkultur

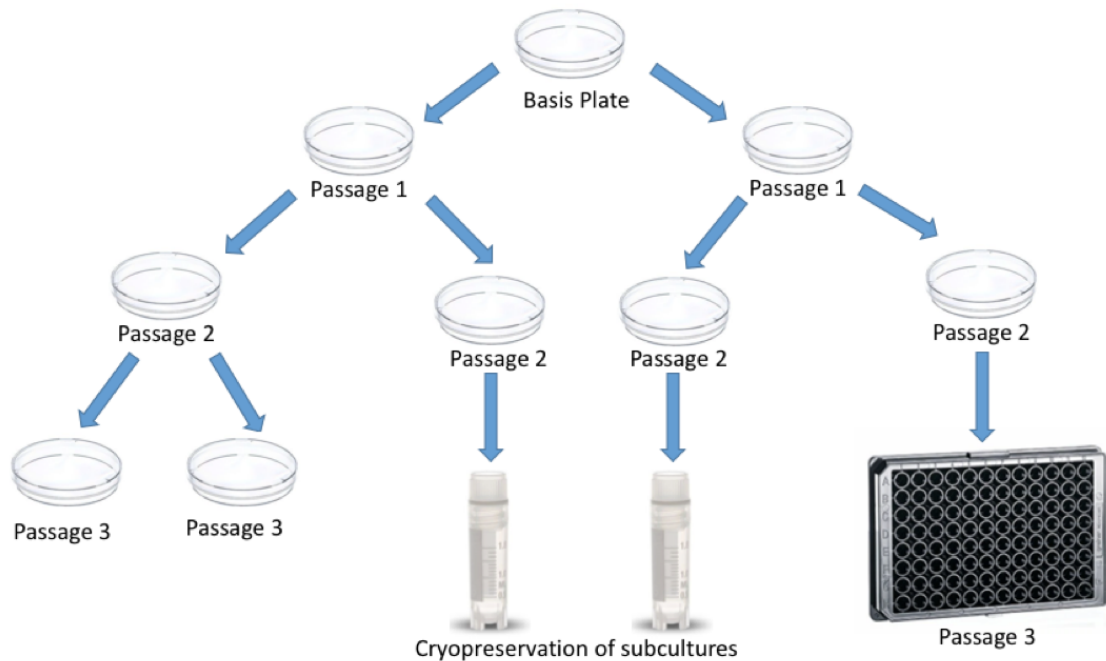


Abb. 7: Schema der Passagierung der GOF in Petrischalen, 96-Well Platten bzw. Cryokonservierung in CryoWells.

3.2.1.2.3. Re-Kultivierung eingefrorener Subkulturen

Bereits eingefrorene Subkulturen bieten ein hohes Maß an Flexibilität. Die eingefrorenen Zellen lassen sich i.d.R. komplikationsfrei wieder in die entnommene Passage (bspw. Passage 2) rekultivieren. Nach einer kurzen Phase des Anwachsens, welche meist nur 5-7 Tage beansprucht, können die Zellen in Passage 3 überführt und somit für ein etwaiges Assay verwendet werden.

Protokoll:

- Laminar Airflow Bench vorbereiten
- 7 ml F-Medium im Wasserbad bei 37°C vorwärmen
- Petrischale beschriften (verschlüsselte Patienten- und Passagenummer, Datum)
- Cryo-Well auftauen und zentrifugieren
- Überstand mit Pasteurpipette der Vakuumpumpe absaugen
- Zellpellet in 1 ml vorgewärmten F-Medium resuspendieren
- 6 ml vorgewärmtes F-Medium auf Petrischale vorlegen
- Resuspendat auf Petrischale verteilen
- Inkubation bei 37°C und 5% CO₂

3.2.1.2.4. Kollagenase-Auslassversuch

Sofern ausreichend Fettgewebe gewonnen werden konnte, wurde eine Gewebeprobe (vgl. 3.2.1.1.2. Zellkultur Anlage) angelegt. Eine äquivalente Menge an Fettgewebe wurde im identischen Verfahren kultiviert, jedoch wurde auf die zwei stündige Inkubation in Kollagenase verzichtet. Die Anlage, anschließende Inkubation, Mediumwechsel und Dokumentation unterschieden sich ansonsten nicht. Bei der Kollagenase Typ IV handelt es sich um eine Protease mit der Fähigkeit, die helikale Struktur des Kollagenfibrillen aufzulösen. Die verwendete Kollagenase wurde aus *Clostridium histolyticum* isoliert. Da sich die Inkubation in Kollagenase auf die Qualität der exprimierten Oberflächenstrukturen nachteilig auswirken kann, wurden zahlreiche Versuche einer Zellkulturanlage ohne Kollagenase unternommen. Diese sind im Ergebnisteil dieser Arbeit aufgeführt.

3.2.2. Mycoplasmentest

Mycoplasmen sind die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryoten (Razin, Yogeve and Naot, 1998). Zellkulturen sind häufig von einer Kontamination mit Mycoplasmen betroffen. Man schätzt, dass ca. 30% aller Zelllinien von einer Mycoplasmen-Kontamination kontaminiert sind (Drexler and Uphoff, 2002). Obwohl Keimzahlen von 10^6 bis 10^8 erreicht werden können, sind sie aufgrund der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops nicht direkt erkennbar. Da die Zellen im Phasenkontrast meist keine Veränderung aufweisen, bleibt eine Kontamination oft lange unentdeckt. Es kann sich jedoch eine Verunreinigung des Mediums zeigen und der routinierte Mikroskopiker kann in den Randbereichen unter Umständen eine Veränderung der Zellmorphologie feststellen. Da Mycoplasmen auf vielfältige Weise in den Stoffwechsel der Zellen eingreifen können, ist eine regelmäßige Überprüfung der Kulturen obligatorisch, um eine gleichbleibende Qualität zu erhalten.

Der Test wurde nach Herstellerangaben des MycoBlue Mycoplasma Detectors der Firma Vazyme Biotech Co. Ltd. transportiert, gelagert und durchgeführt.

Reagenzien des Herstellers:

- MycoBlue Puffer
- MycoBlue Enzym
- Postivkontrolle
- Parafin Oil

Protokoll:

- Proben aus Überständen der zu testenden Zellkulturen gewinnen
- MycoBlue Puffer auftauen und vortexen
- jeweils ein Reaktionssystem aus 24 µl MycoBlue Puffer und 1 µl MycoBlue Enzym erstellen
- Negativkontrolle vorbereiten: 1 µl steriles Wasser zum Reaktionssystem pipettieren
- Positivkontrolle vorbereiten: 1 µl der mitgelieferten Positivkontrolle hinzu pipettieren
- 1 µl Überstand jeder zu testender Zellkultur in beschriftetes Reaktionssystems hinzu pipettieren
- Inkubation auf 60°C für 60 Minuten im Wasserbad
- Ergebnisse ablesen

3.2.3. MMT-Assay

Mit dem MTT-Assay kann die Aktivität der mitochondrialen und cytosolischen Dehydrogenasen lebender, adhärenter Zellen quantifiziert werden. Hierbei dringt 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (MTT) in die Zellen ein, wo ihr Ring aufgebrochen wird und somit das wasserlösliche Formazan entsteht (Mosann et al., 1983; Scudieroo et al, 1988). Die Zellen werden nach der Inkubation lysiert und die Intensität der alkoholischen Formazanlösung kann photometrisch bestimmt oder mithilfe eines ELISA-Lesegerätes automatisiert ausgewertet werden.

Das Assay wurde nach Herstellerangaben der Firma Abcam transportiert, gelagert und durchgeführt.

Reagenzien des Herstellers:

- 50 ml MTT Reagent
- 150 ml MTT Solvent

Protokoll:

- MTT-Reagent auftauen und DMEM im Wasserbad bei 37°C vorwärmen
- je 50 µl MTT-Reagent und DMEM in jede zu testende Einmündung der 96-Well Platte pipettieren
- Inkubation bei 37°C und 5% CO₂
- MTT-Solvent rechtzeitig vor Ende der Inkubation auftauen
- Nach der Inkubation MTT-Reagent und DMEM absaugen
- 150 µl MTT-Solvent in jedes Well pipettieren
- die 96-Well Platte in Alu-Folie wickeln und unter sanftem Rütteln für 15 Minuten inkubieren
- Auslesen der Ergebnisse mittels Tecan Infinite M200 Absorptionsreader

3.2.4. cAMP-Assay

Der Second Messenger cAMP steht in der intrazellulären Signaltransduktion im Zentrum vieler biologischer Prozesse. Nach Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und die daraus resultierende Stimulation der Adenylatzyklase bildet sich das durch dieses Assay detektierbare cAMP. Das gemessene Signal korreliert mit dem Ansprechen eines Rezeptors auf sein aktivierendes Stimulans.

Das cAMP-Screen System wurde nach Herstellerangaben der Firma Applied Biosystems transportiert, gelagert und durchgeführt.

Bestandteile des Kits:

- Zwei vorbeschichtete 96-Well Platten
- Assay/Lysis Puffer
- cAMP Standard
- Anti-cAMP Antikörper
- cAMP-AP Konjugat

- Konjugat Verdünnungspuffer
- Waschpuffer
- CSPD/Sapphire-II RTU Substrate/Enhancer Solution

Im Vorfeld:

Vier Tage vor Durchführung des Assays wurden je 10.000 Zellen/Well (Passage 3) der ausgewählten Zellkulturen in eine 96-Well Platte ausgesät.

Protokoll:

- Vorbereitung Reaktionspuffer-IBMX Gemisch und individuell ausgewählter Stimulanzen
- Erstellung Standards → Verdünnungsreihe aus cAMP-Standard und Assay/Lysis Puffer
- absaugen des Mediums der 96-Well Platte
- Spülung mit 100 µl PBS/Well
- 100 µl Reaktionspuffer-IBMX Gemisch in jedes Well pipettieren
- 100 µl Probe/Well hinzugeben (alle Proben werden in Duplikaten gemessen)
- Inkubation bei 37°C und 5% CO₂, mit den Inkubationszeiten wurde variiert
- Überstände nach Inkubation verwerfen
- 100 µl Assay/Lysis Puffer (vorher vortexen) hinzugeben und bei 37°C, 5% CO₂ für 30 Minuten inkubieren
- Nach Inkubation eingetretene Zelllyse mikroskopisch überprüfen
- cAMP-AP Konjugat 1:100 mit Konjugat Verdünnungspuffer verdünnen
- 30 µl/Well Zelllysate und 60 µl/Well cAMP-Standard Verdünnung in Assay-Platte überführen
- 60 µl/Well anti-cAMP Antikörper hinzupipettieren
- 1h Inkubation auf Mikrotiterplatten-Schüttler (sanftes Rütteln)
- Überstand verwerfen und jedes Well 6x mit 200 µl Waschpuffer spülen
- 100 µl Well CSPD/Sapphire-II Substrat/Enhancer Lösung zugeben und für 30 Minuten inkubieren
- Tecan Infinite M200 Absorptionsreader → Messung des Signals 1 sec/Well Emissionsmaximum ~470 nm

3.2.5. HA-Assay

Unter HA oder auch Hyaluronan, versteht man ein Glykosaminoglykan, welches ubiquitär im humanen Bindegewebe zu finden ist. Es spielt eine Rolle bei der Zellproliferation, -migration und sogar der Tumorentstehung. In der Pathophysiologie der Endokrinen Orbitopathie spielt sie eine wesentliche Rolle, auf welche bereits in der Literaturdiskussion eingegangen wurde.

Das HA-Assay wurde nach Herstellerangaben der Firma Echelon Biosciences transportiert, gelagert und durchgeführt.

Bestandteile des Kits:

- HA Detektionsplatte
- HA Detektor
- HA Standard (1,6 µg)
- 10X Assay Puffer (10 ml)
- TBS Tablets
- TMB Lösung (12 ml)
- 1N H₂SO₄ Stopplösung (10 ml)
- 96-Well Mixplatte (gelb)

Im Vorfeld:

Die Ausplattierung der Zellen (80.000 Zellen/Well, Passage 3) in eine 24/Well Platte, sowie die 24-stündige Stimulation können an einem beliebigen Zeitpunkt vor dem Assay durchgeführt werden. Durch die Stabilität der HA kann der Überstand der Stimulationslösung in einem Eppendorfgefäß eingefroren (-20°C) und bis zum Tag des Assays gelagert werden.

Protokoll:

- alle Reagenzien (bis auf HA-Detektor) auftauen
- TBS Waschpuffer herstellen → 5 Tabletten in 500 ml Ultrapure Water
- Erstellung HA-Standard → 500 µl Ultrapure Water in das HA-Standardgefäß geben
- Verdünnungsreihe aus HA-Standard und Ultrapure Water

- Mischplatte (gelb) auspacken und hierauf je 25 μ l Standard oder Probe mit je 225 μ l Assay Puffer verdünnen
- Detektionsplatte auspacken und 100 μ l jener verdünnten Standards und Proben in Duplikaten übertragen (Blank Wert berücksichtigen → zwei Wells mit 100 μ l Assay Puffer)
- Platte abdecken und eine Stunde bei Raumtemperatur auf Mikrotiterplatten-Schüttler legen (sanftes Rütteln)
- während Inkubation HA-Detektor auftauen und anschließend 12 ml Assay Puffer in HA-Detektorgefäß füllen
- nach Inkubation werden die Wells dreimal mit 200 μ l TBS Puffer gespült
- jedes Well mit 100 μ l HA-Detektor beimpfen
- Platte abdecken und eine Stunde bei Raumtemperatur auf Mikrotiterplatten-Schüttler (sanftes rütteln)
- nach Inkubation werden die Wells dreimal mit 200 μ l TBS Puffer gespült
- In jedes Well 100 μ l TMB Lösung pipettieren
- nach 20-30 Minuten entwickelt sich eine blaue Farbe
- 50 μ l Stopplösung in jedes Well pipettieren
- Absorption mittels Tecan Infinite M200 Absorptionsreader bei 450 nm messen

3.2.6. Melon Gel IgG Spin

Mithilfe des Melon Gel IgG Spin ist es gelungen, Immunglobuline der Klasse G aus Patienten Serum zu isolieren. Die Menge der isolierten Immunglobuline wurde photometrisch bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden u.a. die hier gewonnenen Immunglobuline in diversen Assays zur Stimulation von orbitalen Fibroblasten verwendet.

Der Test wurde nach Herstellerangaben des Melon Gel IgG Spin der Firma Thermo Scientific transportiert, gelagert und durchgeführt.

Bestandteile des Kits:

- Melon Gel IgG Purification Support (3 ml sedimentiertes Gel, 20%ige Suspension, 15 ml Gesamtvolumen)
- Melon Gel Purification Puffer (100 ml)
- Spin Column Accessory Pack (27 Stück)
- Mikrocentrifuge Tubes (30 Stück)

Protokoll:

- Reagenzien an Raumtemperatur adjustieren (ca. 15 Minuten)
- Gefäß mit Purification Support schwenken
- Spin Column in Sammeltube setzen
- 500 µl des Purification Support mit Pipette (weite Mündung) in Spin Column überführen
- Spin Column für eine Minute zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- 300 µl Purification Puffer hinzugeben, 10 Sekunden zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Schritt wiederholen
- Bodenkappe aufsetzen
- 100-500 µl verdünntes/10-100 µl buffer exchanged Serum zur Spin Column geben
- Spin Column verschließen und auf Rotator 5 Minuten auf Raumtemperatur inkubieren
- Bodenkappe entfernen, Kopfkappe lösen und Spin Column in Sammeltube platzieren
- Eine Minute zentrifugieren
- Gel verwerfen ODER aufbereiten

Aufarbeitung des Gels:

- 500 µl von 5 M NaCl oder 0.5 M NaOH hinzugeben und für 5 Minuten zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- Gel 5x mit Purification Puffer waschen, zentrifugieren und Durchfluss verwerfen
- Mit 500 µl Purification Puffer bei 4°C lagern. Gel kann 3x aufbereitet werden

3.2.7. Auswertung

Zur Auswertung der verschiedenen Assays wurde GraphPad Prism 9.0.0 verwendet. Zu Zwecken der Signifikanzbestimmung von Zusammenhängen zwischen ordinalen und kategorialen Variablen wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet, da es sich bei den Versuchen um nicht-normalverteilte Daten handelt. Mit dem Kruskal-Wallis-Test prüft man, ob die Zahl der Werte, die kleiner/größer als der gemeinsame Median mehrerer unabhängiger Variablen sind, sich in den Gruppen unterscheiden. Standen nur zwei unabhängigen Stichproben nicht normalverteilter Daten zur Analyse, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Auch wenn bei Vergleichen von kleinen Fallzahlen (siehe 4.3.1. bis 4.3.7. (n=4)) eine deskriptive Beschreibung der Daten im Vordergrund steht, werden aus Gründen der Anschaulichkeit und Vollständigkeit die p-Werte (ermittelt durch Mann-Whitney-U-Test) angegeben. Für das Signifikanzniveau wurde $\alpha = 5\%$ angenommen.

Tabellarische Darstellungen erfolgten mit dem Programm „Pages 5.6.2“ der Marke Apple Inc. (USA).

3.2.8.2. Verdünnungsschema von K1-70

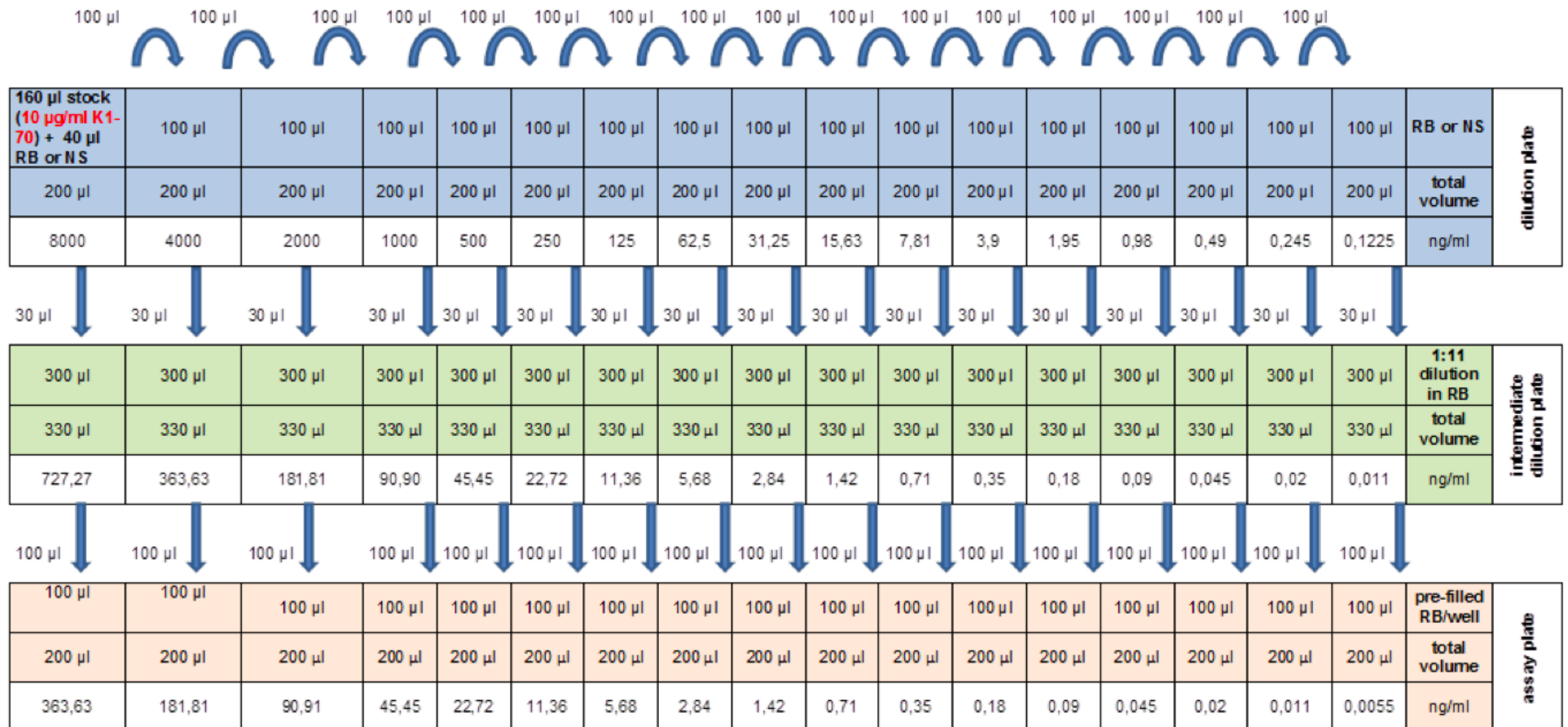


Abb. 8b: Verdünnungsschema zur Vorbereitung von K1-70 aus Stock-Solution.

4. Ergebnisse

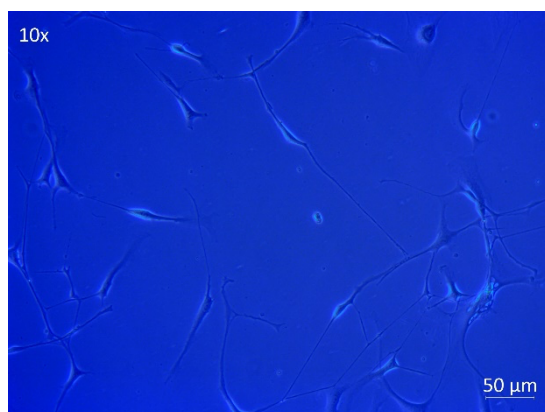
4.1. Fotodokumentation

Bei der nachfolgenden Fotodokumentation handelt es sich um verschiedene Beobachtungsstudien, welche einen orientierenden Eindruck über die morphologische Beschaffenheit der Fibroblasten in den unterschiedlichen Phasen der Kultivierung geben soll. Da zu Beginn der Bemühungen zahlreiche Fragen zu beantworten waren, wurde ein ressourcensparendes Vorgehen gewählt und somit mit geringer Fallzahl gearbeitet.

4.1.1. Wachstumsphasen orbitaler Fibroblasten in Petrischale

Ziel der Beobachtung war es das kontinuierliche Bewachsen der Petrischale sicherzustellen oder entsprechend versagende Kulturen zu identifizieren und zu entsorgen. Die folgenden Aufnahmen protokollieren das Wachstum der Fibroblasten in einer Petrischale über den Zeitraum von 30 Tagen. Bereits nach sieben Tagen konnten vereinzelt Fibroblasten verzeichnet werden, welche nach 21 Tagen in vielen Teilen der Kultur ein konfluentes Wachstum erreicht hatten. Mit einer zwanzigfachen Vergrößerung gelang nach 30 Tagen der mikroskopische Nachweis von Präadipozyten und einer Gesamtkonfluenz.

9a



9b

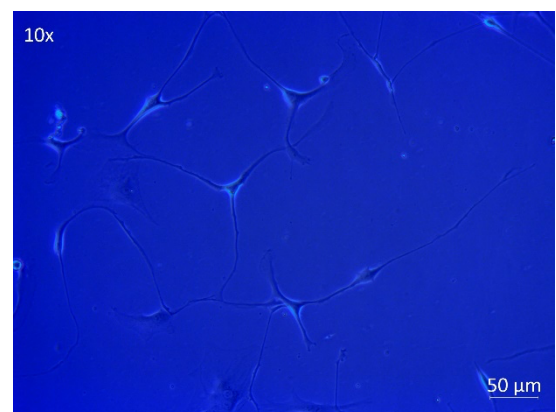


Abb. 9a und b: GOF Patient 104 nach 7d Inkubation (37°C) in einer Petrischale.

In der Kultur sind mikroskopisch bereits nach einer Woche erste Fibroblasten zu finden, wobei es sich hierbei jedoch um vereinzelte Regionen der Petrischale handelt und nicht auf die Gesamtoberfläche zu übertragen ist.

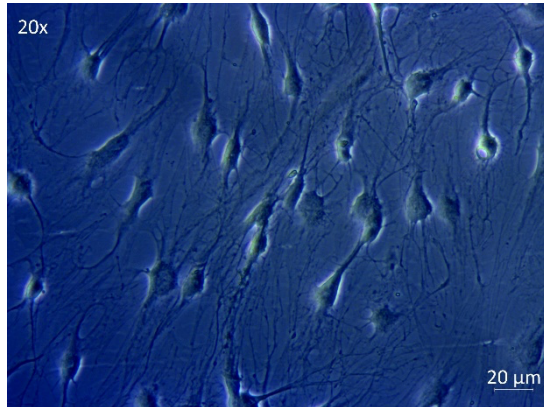
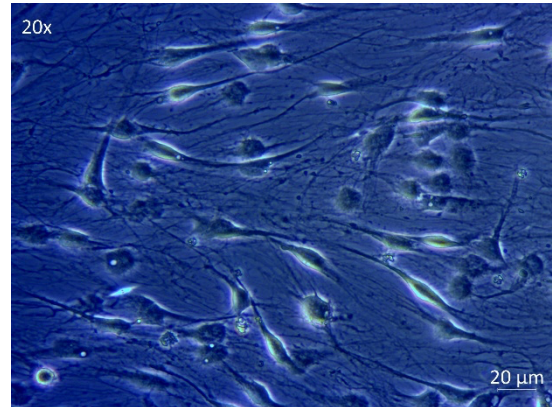
10a**10b**

Abb. 10a und b: GOF Patient 104 nach 21d Inkubation (37°C) in einer Petrischale. Nach drei Wochen ist ein deutlich dichteres Wachstum der Fibroblasten zu erkennen. Die Zellkörper sind breiter, die Zellfortschätze länger.

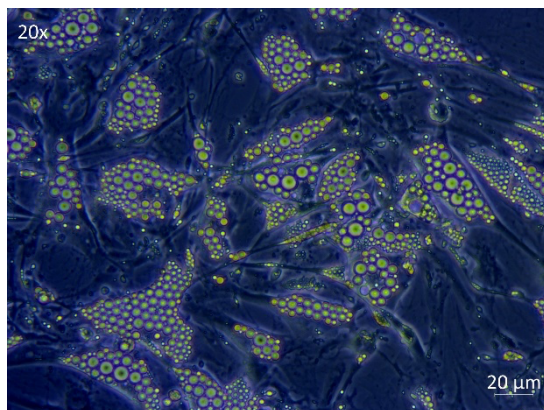
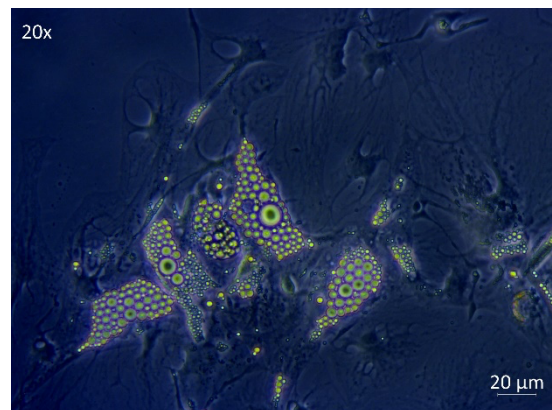
11a**11b**

Abb. 11a und b: Prädipozyten Patient 104 nach 30d Inkubation (37°C) in einer Petrischale. Innerhalb weniger Tage kam es zu einer deutlichen Zunahme von Prädipozyten, welche für ein Signal für eine starke Zellproliferation zu verstehen sind.

4.1.2. Orbitale Fibroblasten in 96-Well Platte vor Assay

Zur Überprüfung der Zellqualität und zur Kontrolle des Anwachsens nach Passagierung in die 96-Well Platte wird jedes Well mikroskopisch auf konfluentes Wachstum überprüft, ehe es für ein Assay freigegeben wird. Es werden 10.000 bzw. 7000 GOF in ein Well der 96-Well Platte eingesät. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen in zwanzigfacher Vergrößerung die Beschaffenheit der Fibroblasten verschiedener Patienten. Dabei handelt es sich um Zellen in Passage 3 am vierten Tag und somit vor ihrer Verwendung in einem Assay.

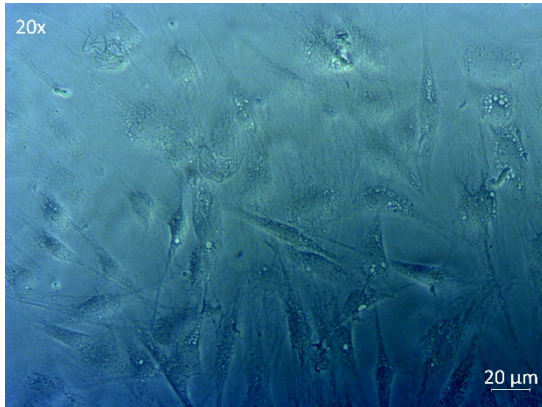
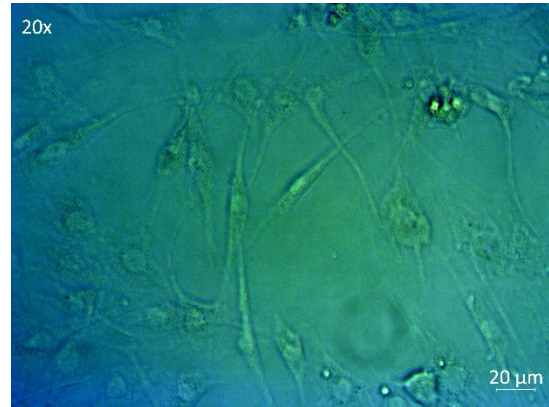
12a**12b**

Abb. 12a und b: GOF Patient 28, 4. Tag in Passage 3. Drei Tage nach ihrer Überführung in die spätere Assay-Platte (96-Well) zeigen die Fibroblasten i.d.R. ein konfluentes Wachstum.

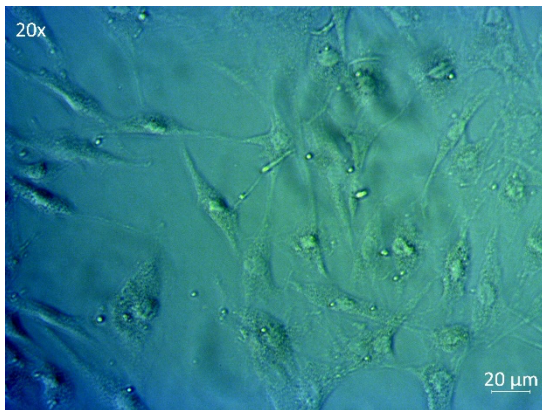
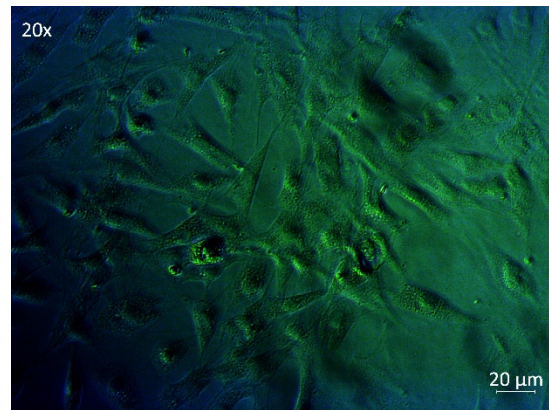
13a**13b**

Abb. 13a und b: GOF Patient 104, 4. Tag in Passage 3. Gelegentlich sieht man in der 96-Well Platte Regionen, in welchen die Fibroblasten überdurchschnittlich dicht gewachsen sind.

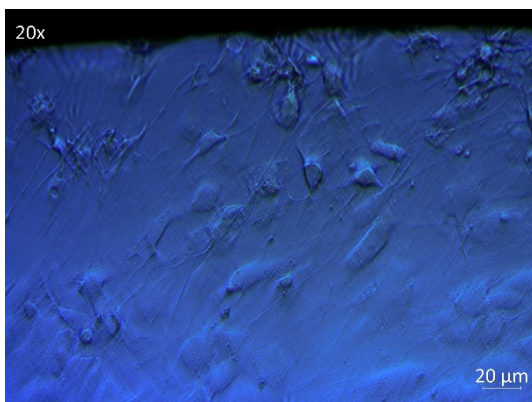
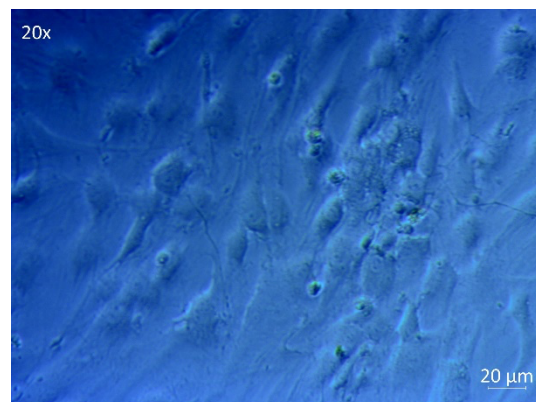
14a**14b**

Abb. 14a und b: GOF Patient 35 und 58 (gepoolt), 4. Tag in Passage 3. Auch in den Randbereichen der Wells setzt sich das Fibroblastenwachstum gleichmäßig fort.

4.1.3. Morphologie von Basisplatten über acht Monate

Ziel der Beobachtung war es die morphologischen Begebenheiten bzw. der etwaige Verlust der Zellstruktur über einen Zeitraum von 241 Tagen zu beurteilen. Die im Folgenden gezeigten Abbildungen zeigen GOF in ihrer Basisplatte über den Zeitraum von acht Monaten. Nachdem die Petrischale ein konfluentes Wachstum zeigte, folgte die Subkultivierung der Zellen, wobei die Basisplatte insgesamt sechs mal erneut kultiviert werden konnte. Die Viabilität der verschiedenen Subkultivierungen ist unter 4.2. beschrieben.

15a

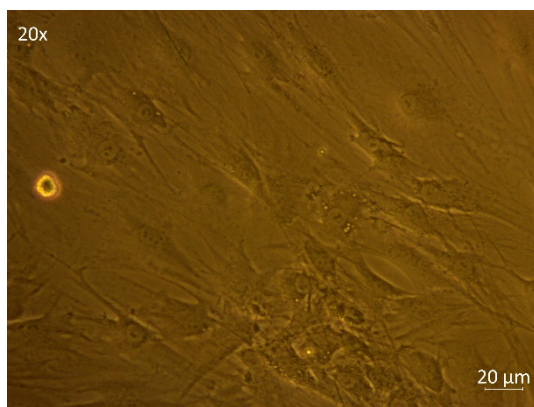


Abb.15a: GOF Patient 58 nach 40d zum ersten Mal konfluent in Basisplatte.

15b

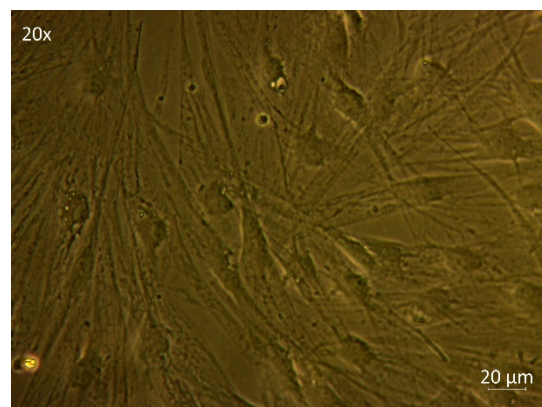


Abb. 15b: GOF Patient 58 nach 72d zum zweiten Mal konfluent in Basisplatte.

15c

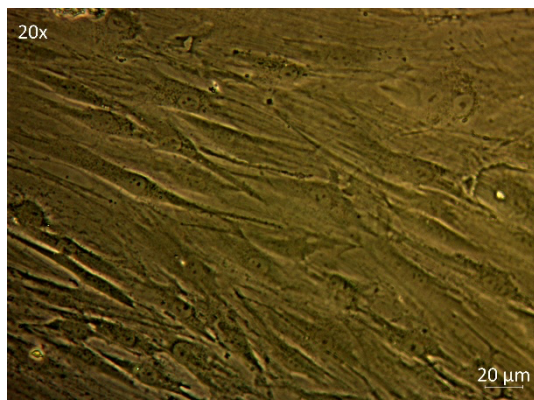


Abb. 15c: GOF Patient 58 nach 109d zum dritten Mal konfluent in Basisplatte.

15d

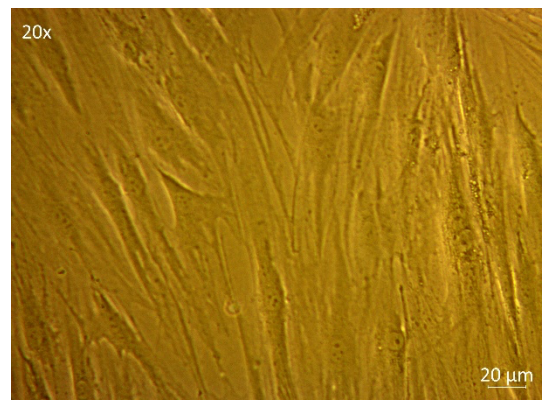


Abb.15d: GOF Patient 58 nach 148d zum vierten Mal konfluent in Basisplatte.

15e

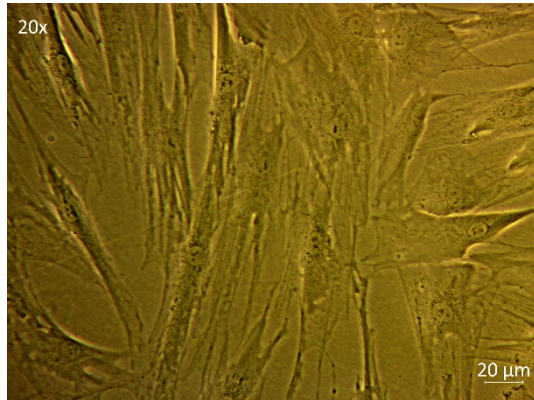


Abb.15e: GOF Patient 58 nach 193d zum fünften Mal konfluent in Basisplatte.

15f

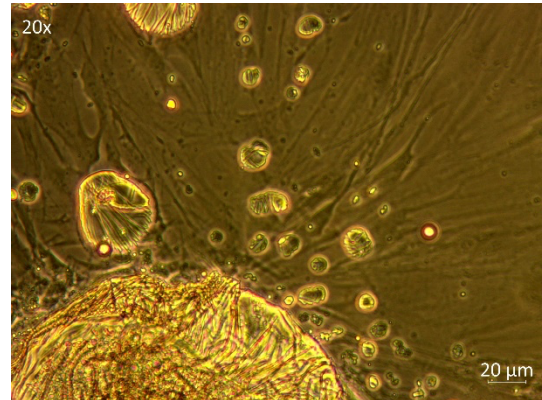


Abb.15f: GOF Patient 58 nach 241d zum sechsten Mal konfluent in Basisplatte.

4.1.4 Konfluentes Wachstum nach Kryokonservierung

Um etwaige Unterschiede der Zellmorphologie im zeitlichen Verlauf der Kryokonservierung zu erfassen, stand nach Re-Kultivierung die mikroskopische Beurteilung der Fibroblasten im Vordergrund. Im Folgenden sind die GOF von Patient 35, 58 und 72 sieben Tage nach Re-Kultivierung in Passage 2 zu sehen, nachdem diese bei -80°C kryokonserviert wurden. Konfluentes Wachstum wird im weiteren Verlauf von beiden Patienten auch nach 12 Monaten Kryokonservation erreicht.

16a

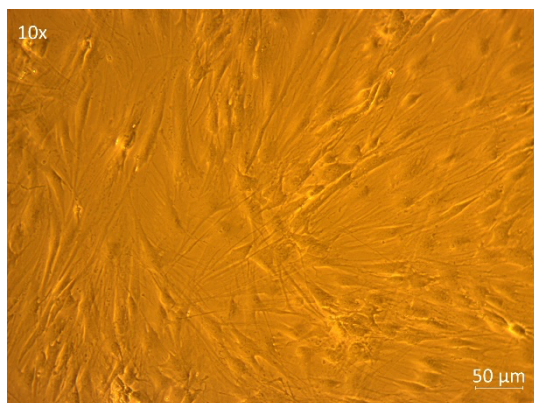


Abb. 16a: GOF Patient 35 rekultiviert nach sechs Monaten Kryokonservation.

16b

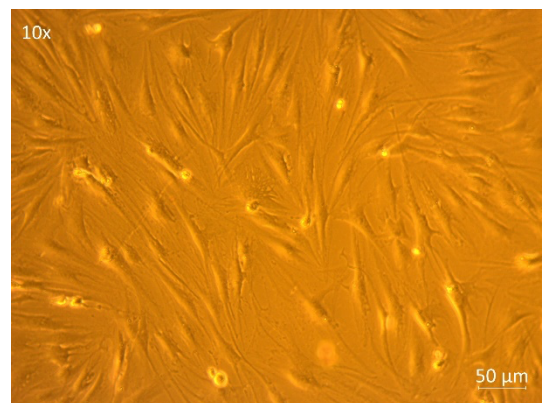


Abb. 16b: GOF Patient 35 rekultiviert nach 12 Monaten Kryokonservation.

17a

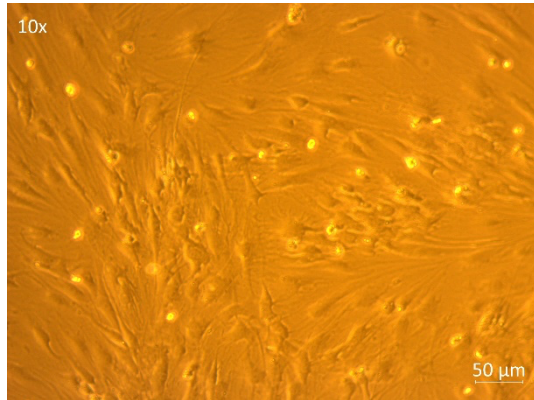


Abb. 17a: GOF Patient 58 re kultiviert nach sechs Monaten Kryokonservation.

17b

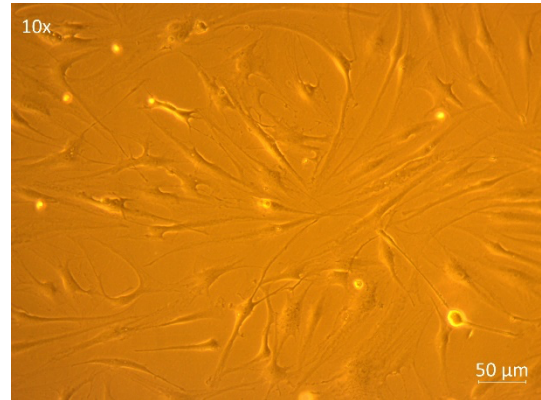


Abb. 17b: GOF Patient 58 re kultiviert nach 12 Monaten Kryokonservation.

18a

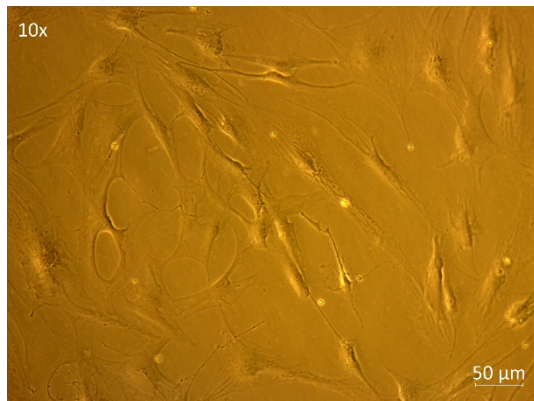


Abb. 18a: GOF Patient re kultiviert 72 nach sechs Monaten Kryokonservation.

18b

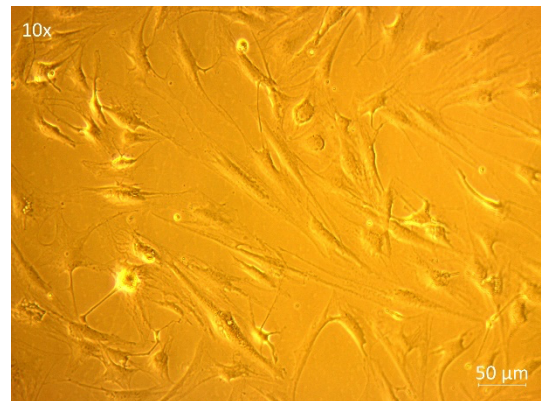


Abb. 18b: GOF Patient 72 re kultiviert nach 12 Monaten Kryokonservation.

4.1.5. Vergleich nach Anlage der Zellkultur mit/ohne Kollagenase

Ziel des Experiments war es eine orientierende Einschätzung über den zelltoxischen Einfluss der Kollagenase zu erhalten, wobei erneut die morphologischen Aspekte im Vordergrund standen. Als Vergleichszeitpunkt (Morphologie und Bestimmung Zellzahl) wurde Tag 30 nach Kultivierung in der Basisplatte (Petrischale) gewählt. Während bei Pat. 79 zu diesem Zeitpunkt bereits in beiden Platten ein konfluentes Wachstum zu erkennen ist, zeigen die Fibroblasten von Pat. 85 und 86 in beiden Anlageverfahren ein deutlich langsames Wachstum. Mikroskopisch lässt sich in keinem der drei Patientenvergleiche ein Unterschied zwischen den beiden Verfahren (Anlage mit/ohne Kollagenase) feststellen.

19a

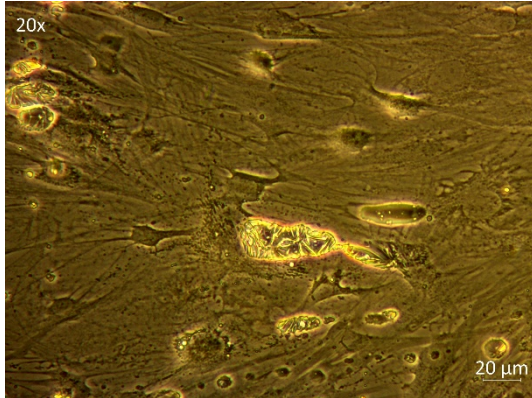


Abb. 19a: GOF Pat. 79, mit Kollagenase. Die Kultur zeigt nach 30 Tagen ein sehr dichtes Wachstum der Fibroblasten.

19b

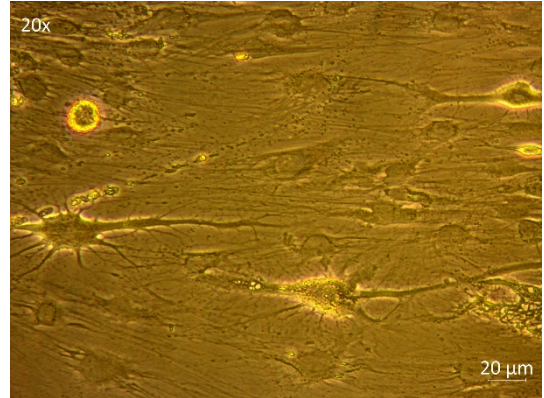


Abb. 19b: GOF Pat. 79, ohne Kollagenase. Auch in diesem Verfahren zeigt sich ein dichtes Bewachsen der Petrischale.

20a

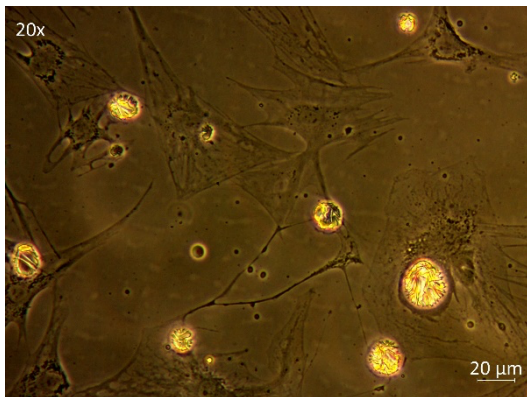


Abb. 20a: GOF Pat. 85, mit Kollagenase. Zu sehen ist eine Beispielkultur für ein schwächeres Wachstum der Fibroblasten.

20b

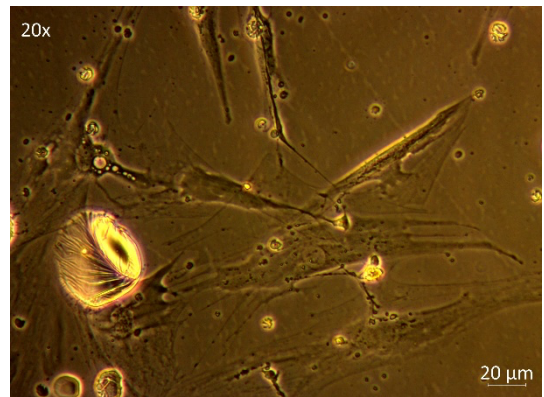


Abb. 20b: GOF Pat. 85, ohne Kollagenase. Die Morphologie unterscheidet sich unwesentlich gegenüber dem anderen Verfahren.

21a

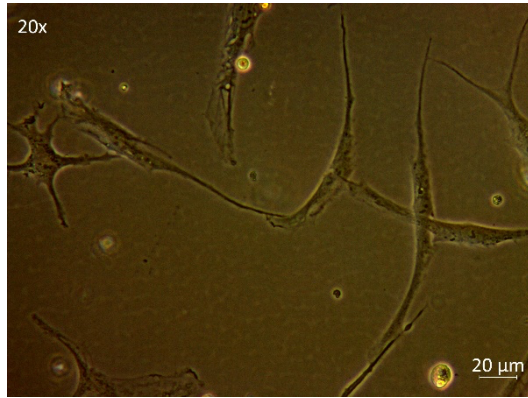


Abb. 21a: GOF Pat. 86, mit Kollagenase. In der Kultur wirken die Zellkörper weniger stark ausgebildet als im Verfahren ohne Kollagenase.

21b

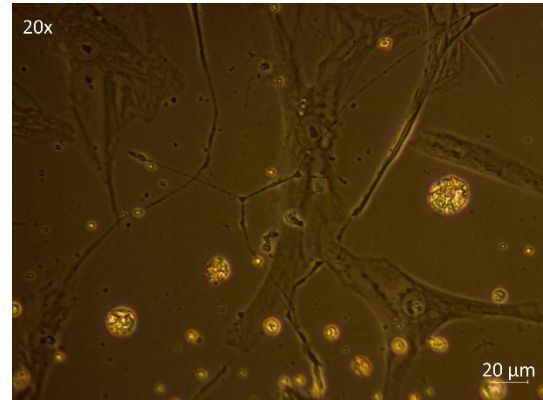


Abb. 21b: GOF Pat. 86, ohne Kollagenase. Erwartungsgemäß gewachsen nach 30 Tagen.

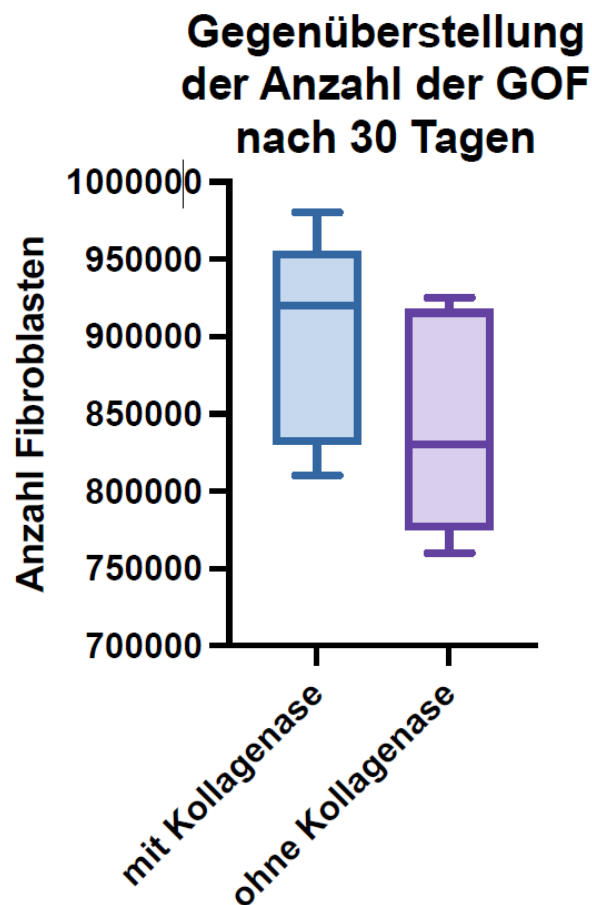
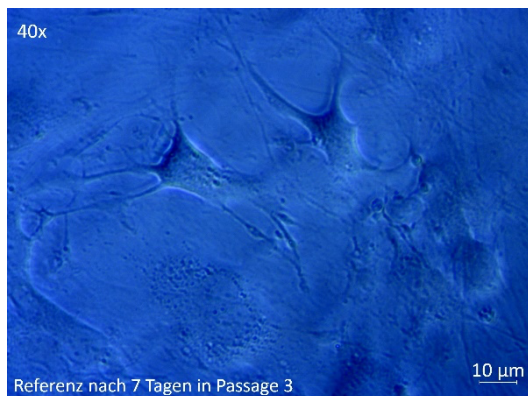


Abb. 22: Gegenüberstellung der Anzahl der GOF nach 30 Tagen mittels zweier Anlagemethoden (Kollagenase/ohne Kollagenase). Verglichen wurden jeweils fünf GOF-Kulturen (n=5). Im Mann-Whitney-U-Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Anlageverfahren festgestellt werden ($p=0,222$).

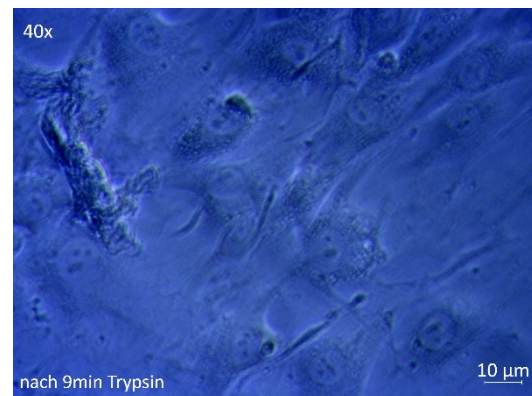
4.1.6. Morphologische Veränderungen nach Trypsin-Einwirkung

Da für die Passagierung der Zellen Trypsin Verwendung findet, interessiert auch hier der Einfluss des Trypsins über die Zeit auf die Zellmorphologie. Die folgenden Abbildungen zeigen einen Ausschnitt einer konfluenten Petrischale in 40-facher Vergrößerung unter Trypsin-Einwirkung. Die Zellen der in dieser Arbeit verwendeten Assays wurden zwecks Passagierung nie länger als 8 Minuten bzw. 3 Minuten der Trypsinierung ausgesetzt. Nach dreifacher Passagierung/Trypsinierung (8 Minuten - 3 Minuten - 3 Minuten) oder Trypsinierung zwecks Kryokonservierung (+3 Minuten), betrug die kumulative Zeit unter Trypsin-Einwirkung nie mehr als 17 Minuten. Abb. 22d zeigt, dass die Zellstruktur nach 30 Minuten noch erhalten ist. Es kommt jedoch zur Trübung des Trypsin-Überstandes. Eine Aussage über die Beschaffenheit der Rezeptoren ist nicht zulässig. Der Viabilitätsverlust wird unter 4.2.2. beschrieben.

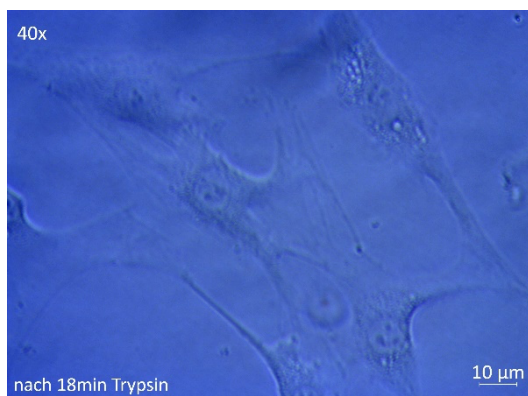
23a



23b



23c



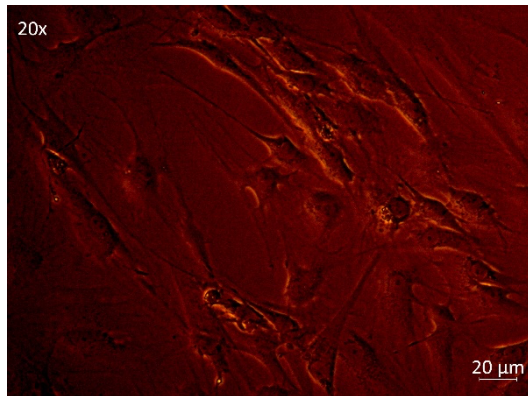
23d



Abb. 23a-d: GOF Patient 35/58 (gepoolt), 4. Tag in Passage 3, Einwirkung von Trypsin. Gezeigt ist im zeitlichen Verlauf die Trübung des Überstandes. Dabei sieht man auch ein Schwimmen der abgelösten Fibroblasten.

Nach 30 Minuten Trypsininkubation konnte durch anschließender Passagierung (in Passage 4) binnen sieben Tagen erneut ein konfluentes Wachstum erreicht werden. Dies spricht für die Widerstandsfähigkeit der GOF. Die kumulative Einwirkzeit von Trypsin betrug 44 Minuten.

24a



24b

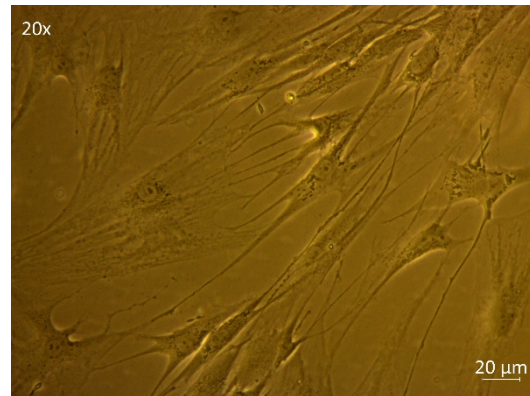


Abb 24a und b: GOF Patient 35/58 (gepoolt), 7. Tag in Passage 4, nach 30 Minuten Trypsinierung (kumulativ 44 Minuten). Die Fibroblasten erreichen auch nach langer Trypsin-Einwirkung wieder ein konfluentes Wachstum. Morphologisch kann kein Abfall der Zellqualität erkannt werden.

4.2. Viabilitätsbestimmung mittels MTT-Assay

4.2.1. Vergleich der Subkultivierungen 1-6

Dieser Versuch diente der Identifizierung der Stoffwechselaktivität verschiedener Subkultivierungen (S1-S6), um für die nachfolgenden Stimulationsassays lediglich Zellen mit einem geeigneten Viabilitätsprofil einzusetzen. Dabei wurden die GOF von Patient 35 und 58 sechs Mal aus ihrer Basisplatte heraus subkultiviert, was jeweils nach konfluentem Bewachsen der Petrischale geschah. Die Viabilitätsbestimmung erfolgte in Passage 3. Für Boxplot S1-S3 gilt $n=20$, für S4-S6 gilt $n=16$.

Es zeigt sich eine höhere Stoffwechselaktivität der jüngeren Subkultivierungen (S1-S3), wohingegen es in S4-S6 zu einem Abfall der Stoffwechselaktivität kommt. Im Kruskal-Wallis-Test zeigt sich ein hochsignifikanter Zusammenhang ($p < 0,0001$). Vergleicht man die Mittelwerte der Messungen, so kommt es zwischen S1 und S3 zunächst zu einem geringen Anstieg der Viabilität. Zwischen S4 bis S6 ist ebenfalls keine klare Progredienz des Viabilitätsverlustes zu erkennen.

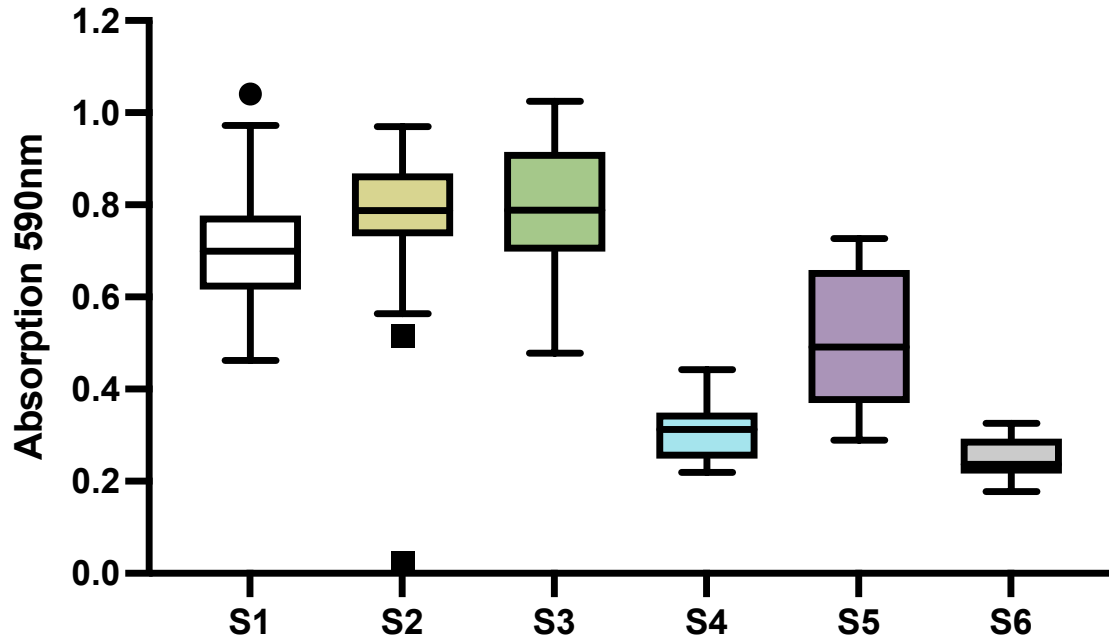


Abb. 25: Stoffwechselaktivität der Subkulturen 1-6 (S1-S6) von Pat. 35 und 58.

4.2.2. Auswirkungen von Trypsin auf GOF

Die im Folgenden dargestellten Boxplots zeigen den Einfluss von Trypsin auf die Stoffwechselaktivität der GOF. Neben der morphologischen Qualität, welche in der Fotodokumentation beschrieben wurde, wurde auch eine quantifizierbare Viabilitätsbestimmung nach Trypsineinwirkung vorgenommen, um den Verlust der Zellqualität im Kultivierungsverlauf einzuschätzen. Die GOF wurden im Anschluss an die Trypsininkubation re-inkubiert, sodass das MTT-Assay nach vier Tagen durchgeführt werden konnte.

Das Assay wurde mit gepoolten GOF von Patient 35 und 58 durchgeführt. Die Zellen wurden in Passage 2 (Subkultivierung 5) cryokonserviert und gingen somit mit einer Hypothek von 14 Minuten Trypsininkubation in das Assay (siehe 3.2.1.1.5. Subkultivierung), somit sollten die Ergebnisse in Relation zum gezeigten Referenzwert (keine neue Inkubation von Trypsin) beurteilt werden. Für jeden Boxplot gilt $n=6$.

Vergleicht man den Median, so führt die Inkubation der GOF in Trypsin nach 3 Minuten ($\bar{x}=0,305$), 9 Minuten ($\bar{x}=0,203$) sowie nach 18 Minuten ($\bar{x}=0,226$) zu einem progredienten Viabilitätsverlust der Fibroblasten. Nach 30 Minuten ($\bar{x}=0,284$) ist der Verlust der Viabilität jedoch scheinbar reversibel. Der Zusammenhang im Kruskal-Wallis-Test ist nicht signifikant ($p=0,06$). Der Referenzwert ($\bar{x}=0,453$) liegt deutlich über den anderen Werten.

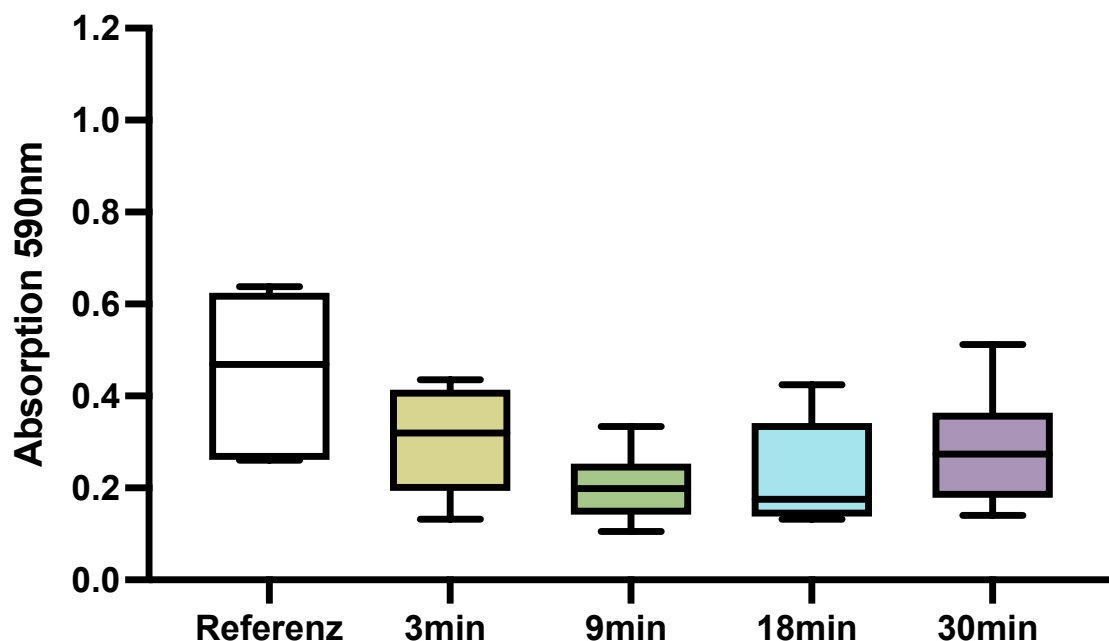


Abb. 26: Stoffwechselaktivität der GOF nach Inkubation mit Trypsin.

4.2.3. GOF Stoffwechselaktivität nach Kryokonservierung

Da die Kryokonservierung von orbitalen Fibroblasten eine hohe zeitliche Flexibilität ermöglicht, ist es von großer Bedeutung, den Viabilitätsverlust der GOF während der Zeitspanne der Kryokonservierung (-80°C) zu bestimmen. Im Folgenden wurden die GOF von Patient 35 und 58 in Passage 3 (Subkultivierung 1) über sechs, neun und 12 Monate kryokonserviert. Nach erfolgreicher Rekultivierung in einer 96-Well Platte konnte am vierten Tag das MTT-Assay bei konfluentem Wachstum durchgeführt werden. Für jeden Boxplot gilt n=10.

Der rasche Abfall der Viabilität und die resultierenden Absorptionswerte (v.a. Mittelwerte) belegen die essentielle Bedeutung optimaler Kulturbedingungen für die Stoffwechselaktivität der GOF. Nach allen drei Zeitspannen kommt es, verglichen zum Ausgangswert, zu einem deutlichen Viabilitätsverlust. Ebenso besteht ein hochsignifikanter Zusammenhang im Kruskal-Wallis-Test ($p < 0,0001$). Nach 9 Monaten stagniert die Viabilität, nach 12 Monaten zeigt sich eine leichte Regeneration der Viabilität im Mittelwertniveau.

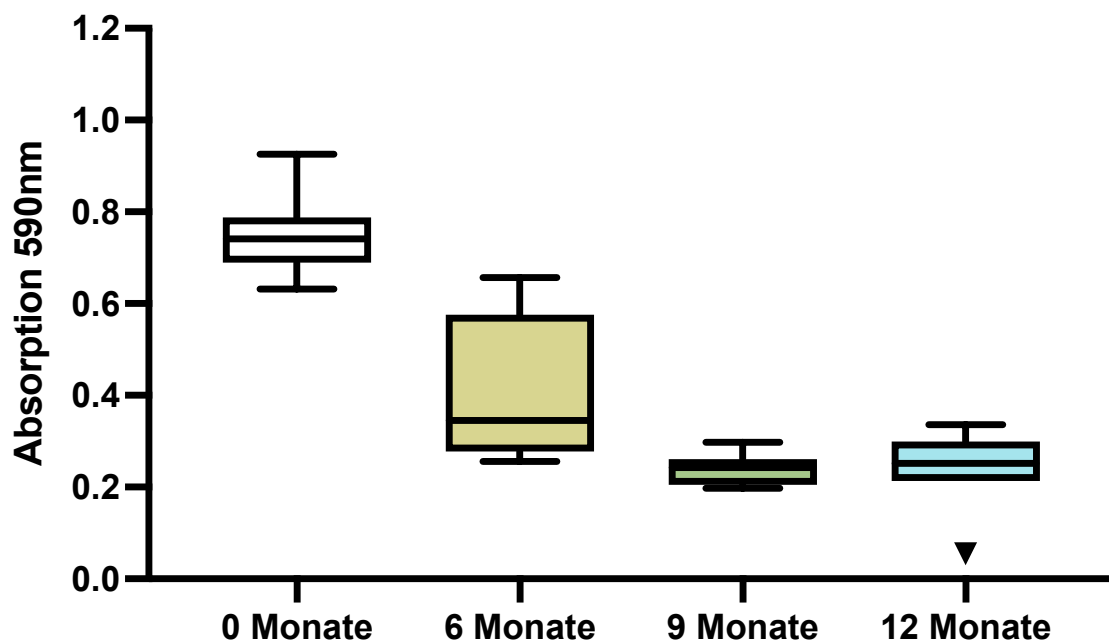


Abb. 27: Stoffwechselaktivität GOF nach sechs, neun und 12 Monaten Kryokonservierung.

4.2.4. Gegenüberstellung der Stoffwechselaktivität nach Serum und IgG-Reaktionspuffer Stimulation

Die GOF von Patient 35 und 58 wurden vier Stunden in vier verschiedenen Seren (1248, 1441, 7976, 8072) bzw. den aus den jeweiligen Seren isolierten Immunglobulinen der Klasse G (verdünnt im Reaktionspuffer) stimuliert. Neben den Ergebnissen der Stimulation, welche unter 4.3. und 4.4. dargestellt werden, interessiert der Viabilitätsverlust der Zellen nach erfolgter Stimulation. Der Versuch diente somit der orientierenden Abschätzung der Viabilitätsminderung der Zellen welche das Nährmedium bzw. Serum entzogen wurde und in nährstoffarmen Puffer inkubierten. Es muss berücksichtigt werden, dass für diesen Versuch Zellen der jeweils vierten Subkultivierung (Passage 3) verwendet wurden, was die niedrigen Viabilitätswerte im folgenden Diagramm erklärt (vergleiche 4.2.1.). Für jeden Boxplot gilt $n=8$.

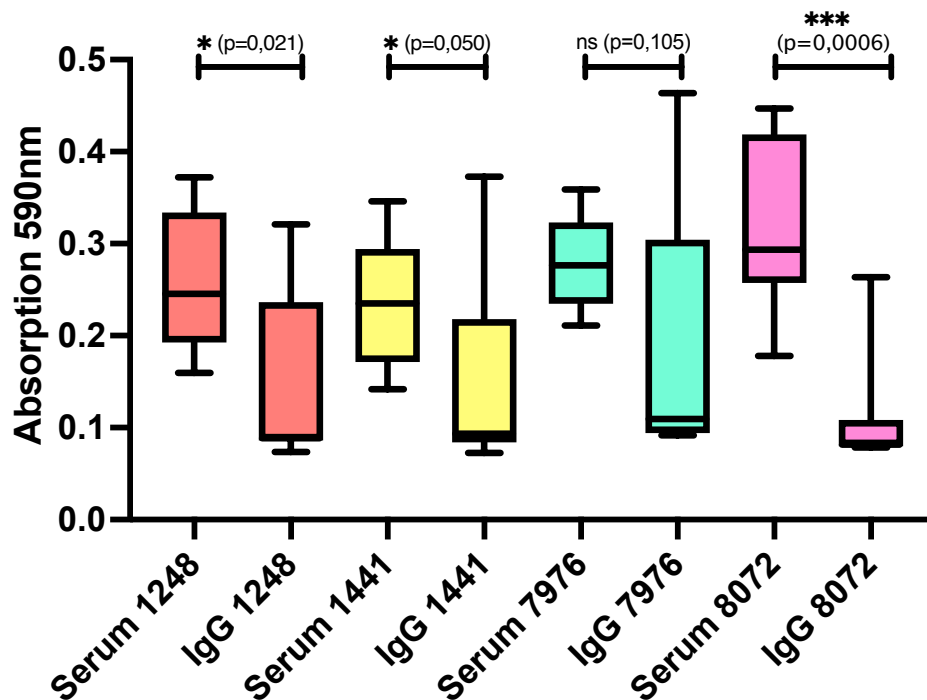


Abb. 28: GOF Inkubation in Serum vs IgG-Reaktionspuffer.

Die Messungen belegen die Wichtigkeit eines Kulturmediums im Umgang mit Zellkulturen. Bereits nach vierstündiger Inkubation fällt der Mittelwert der Stoffwechselaktivität in allen medium- bzw. serumfreien Proben deutlich ab. Signifikant ist der Viabilitätsverlust im Mann-Whitney-U-Test in den Serum-/IgG-Proben 1248, 1441 und 8072 (P-Werte siehe Abbildung). Der Viabilitätsverlust in Serum-/IgG-Probe 7976 war nicht signifikant.

4.2.5. Auswirkungen von Inhibitoren des TSH-Rezeptors

Um den Einfluss neuer molekularer TSH-Rezeptor-Inhibitoren (SYD5115 und Org 274179-0) bzw. des monoklonalen Antikörpers K1-70 auf die Stoffwechselaktivität von GOF zu untersuchen, wurde ein MTT-Assay mit GOF von zwei verschiedenen Gewebespendern (Patient 28 und 104 - Passage 1 - Subkultivierung 2) durchgeführt. Zur Vermeidung des Viabilitätsverlusts von mediumfreien Reaktionspuffer, welcher in den Stimulationsversuchen als Trägersubstanz dient, wurden die Substanzen in diesem Assay in F-Medium inkubiert. Als Referenz dienen die Boxplots des F-Mediums. Ergänzend zeigt die Abbildung den Viabilitätsverlust durch mediumfreien Reaktionspuffer. Die Inkubation erfolgte über 24h und mit den höchsten Konzentrationen der jeweiligen Substanzen, die von uns in den Inhibitionsversuchen eingesetzt wurden. Für jeden Boxplot gilt n=10.

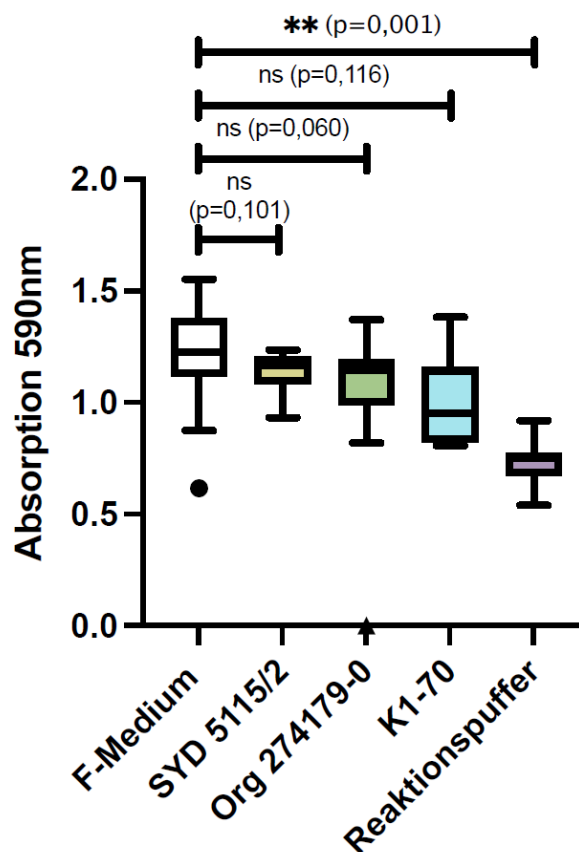


Abb. 29: Viabilität Patient 35 + 58 (kumulativ) unter Inkubation mit Inhibitoren.

Weder SYD5115/2 noch Org 274179-0 führten zu einem signifikanten Abfall der Viabilität. K1-70 und Reaktionspuffer führten jedoch in der Inkubation mit den GOF von Patient 35 zu einem signifikanten Viabilitätsverlust. In der kumulativen Darstellung bleibt nur der Viabilitätsverlust von Reaktionspuffer signifikant.

4.3. GOF Stimulations- und Inhibitionsversuche im cAMP-Assay

Nach Etablierung eines erfolgreichen Kultivierungsprozesses stand vorerst die Untersuchung der Stimulationsfähigkeit der GOF im Vordergrund. Dabei interessierte das Potential unterschiedlicher Substanzen, die Stimulations- und Messzeiten, sowie Unterschiede der Serum-/IgG-Proben.

In Anbetracht der Vielzahl der Experimente, wurde sich bzgl. der Verifizierung des Versuchsaufbaus (4.3.1. bis 4.3.6.) auf eine orientierende Untersuchung mit kleinen Fallzahlen (n=4) beschränkt. Ziel war vordergründig eine Identifizierung von auffälligen Messungen, welche im Dissens zur aktuellen Datenlage stehen. Später wurden die inhibitorischen Potentiale verschiedener low molecular weight (LMW) Compounds bestimmt, wozu meist mehrere GOF-Kulturen untersucht wurden (n=2-12).

Für die folgenden Versuche wurden 10.000 GOF/96-Well und, sofern nicht anders angegeben, Fibroblasten in Passage 3 verwendet. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte der Messreihen. Der Standardfehler wurde als Fehlerbalken integriert. Bei allen Patient*innen bestand eine Endokrine Orbitopathie bei Morbus Basedow. Zur Konservierung von cAMP wurde bei allen Versuchen dieses Kapitels IBMX 30 Minuten vor Beginn der Stimulation/Inhibition vorinkubiert. Für jede Messplatte wurde eine cAMP Standardkurve erstellt, anhand derer die Umrechnung der Relativen Lichteinheiten (RLU) in pMol ermöglicht wurde. In vereinzelt Messungen lagen die Werte oberhalb der erstellten Standardkurve, was gleichbedeutend mit sehr niedrigen cAMP-Werten (pMol) ist. In diesen Fällen wurde die Konzentration näherungsweise mit 0 pMol angegeben.

Die p-Werte wurden zur Vollständigkeit immer angegeben. In den Experimenten mit kleinen Fallzahlen besitzt er jedoch nur eine eingeschränkte Aussagekraft. Daher sind bei einem n von

≤ 5 deskriptive Vergleiche der Mittelwerte aufgeführt. In den Verdünnungsreihen mit kleiner Fallzahl empfiehlt es sich hingegen an den Abbildungen zu orientieren.

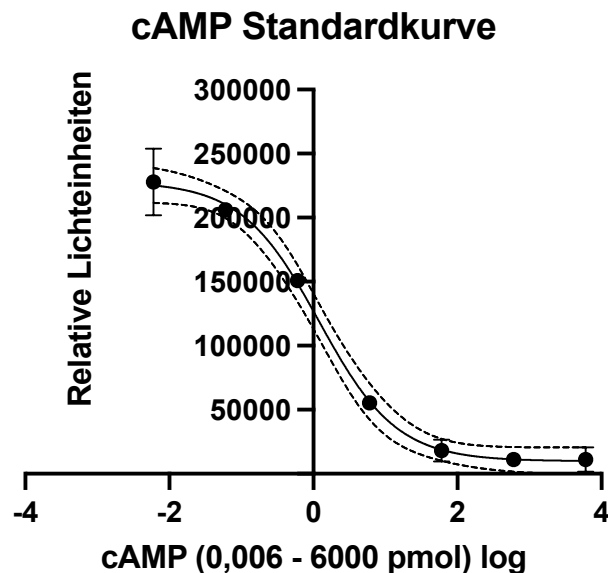


Abb. 30: Exemplarische Standardkurve des cAMP-Assays.

4.3.1. Nachweis der Stimulationsfähigkeit der GOF Zellkultur

Zum Nachweis der Stimulationsfähigkeit wurde Forskolin, ein direkter Stimulator des Enzyms Adenylatcyclase, der monoklonale Antikörper M22, Serum bzw. Serumverdünnungen von Patienten mit Morbus Basedow und aus dem Patientenserum isolierte Immunglobuline der Klasse G verwendet. Da die optimale Inkubationszeit zu Beginn unbekannt war, wurden die Inkubationszeiten 120 Minuten und 240 Minuten ausgewählt und verglichen. Die Messungen wurden mittels Tecan Infinite M200 Absorptionsreader nach 30-, 45- und 60 Minuten nach Inkubation der Substrat/Enhancer Lösung durchgeführt (siehe 3.2.4.). Die deskriptive Analyse sowie die p-Werte beziehen sich auf die Messzeit nach 30 Minuten. Die Konzentrationen der Stimulatoren sowie die Serumverdünnungen sind aus den Abbildungen ersichtlich. Das Primärziel des Experiments war es die stimulatorischen Potentiale der GOF-Kulturen zu ermitteln und zu unterscheiden, welches Signal unspezifisch über verschiedene Signalkaskaden (Forskolin, Serum) oder spezifisch über den TSH-Rezeptor Pathway (M22) vermittelt wurde. Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse der unterschiedlichen Messzeiten und der einzelnen GOF-Spender*innen findet sich im Anhang. Es ergibt sich n=4.

Vergleicht man die zweistündige ($\bar{x}=0,132$) mit der vierstündigen ($\bar{x}=0,058$) M22-Stimulation, ist die kürzere Stimulationszeit der längeren überlegen ($p=0,314$). Das gleiche Fazit kann nach dem Vergleich von zwei- ($\bar{x}=1,323$) und vierstündiger

($\bar{x}=0,885$) Stimulation durch Forskolin gezogen werden ($p=0,486$). Wird nun der Effekt der zweistündigen M22-Stimulation ($\bar{x}=0,132$) mit der zweistündigen Forskolin-Stimulation verglichen ($\bar{x}=1,323$), zeigt sich ein deutlich höheres Signal durch den unspezifischen Stimulator Forskolin ($p=0,029$).

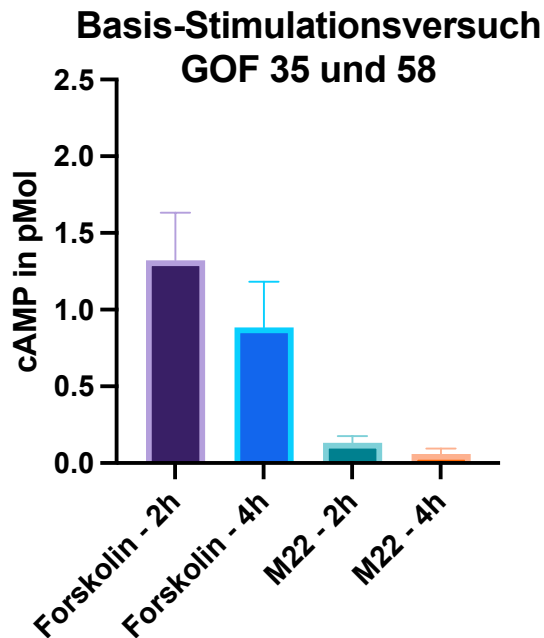
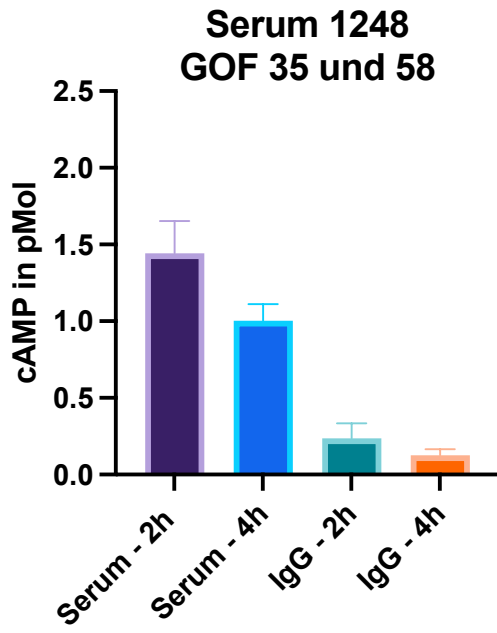


Abb. 31: Basisstimulationsversuch von M22 und Forskolin in GOF Kultur 35 und 58. [c] M22 = 0,0001 $\mu\text{g/ml}$, [c] Forskolin = 200 μMol

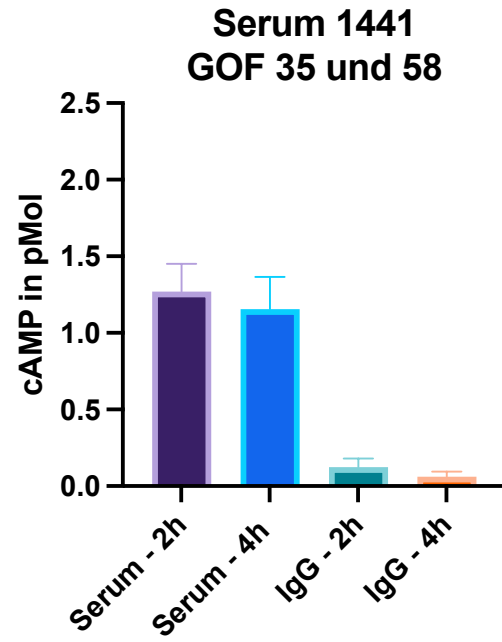
In allen Vergleichen der Seren gegen ihr Immunglobulin wird bestätigt, dass kürzere Stimulationszeiten von zwei Stunden ein höheres Signal liefern (siehe Abb. 32a bis 32d). Des Weiteren erreichen die Seren ein deutlich höheres cAMP-Signal als die Immunglobuline.

Die Stimulation „Serum 1248 - 2h“ ($\bar{x}=1,443$) erreicht gegenüber der Stimulation „IgG - 2h“ ($\bar{x}=0,237$) ein signifikant höheres cAMP Signal ($p=0,029$). Diese Beobachtung deckt sich ($p= 0,029$) bei einem Vergleich von „Serum 1441 - 2h“ ($\bar{x}=1,270$) und „IgG 1441 - 2h“ ($\bar{x}=0,123$). Aber auch der Vergleich von „Serum 7976 - 2h“ ($\bar{x}=1,769$) gegen „IgG 7976 - 2h“ ($\bar{x}=0,173$) und „Serum 8072 - 2h“ ($\bar{x}=1,233$) gegen „IgG 8072 - 2h“ ($\bar{x}= 0,013$) zeigen einen signifikanten Unterschied (beide $p=0,029$).

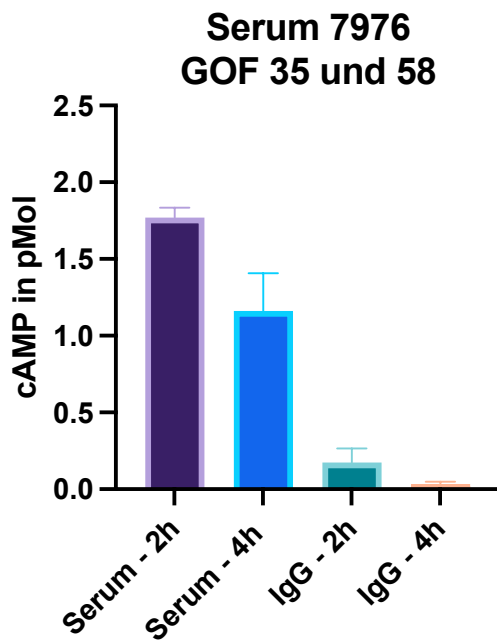
32a



32b



32c



32d

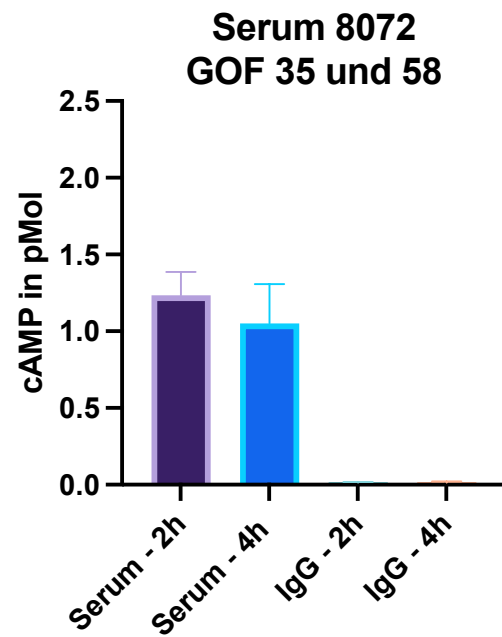


Abb. 32a-d: Stimulationsversuche Serum-/IgG für GOF 35 und 58 (kumulativ).

[c] IgG = 1000 µg/ml

Im nachfolgenden Experiment wurden zwei Serum-Proben mit Reaktionspuffer verdünnt und eine Stimulationszeit von nur 30 Minuten gewählt. Die 1:10 Verdünnung von Serum 1441 ($\bar{x}=0,042$) bewirkt ein schwächeres Signal als die 1:5 Verdünnung ($\bar{x}=0,078$), jedoch wird das Signifikanzniveau nicht erreicht ($p=0,686$). Auch der Vergleich der 1:10 Verdünnung ($\bar{x}=0,056$) von Serum 5517 gegen die 1:5 Verdünnung ($\bar{x}=0,098$) erreicht keine Signifikanz ($p=0,343$).

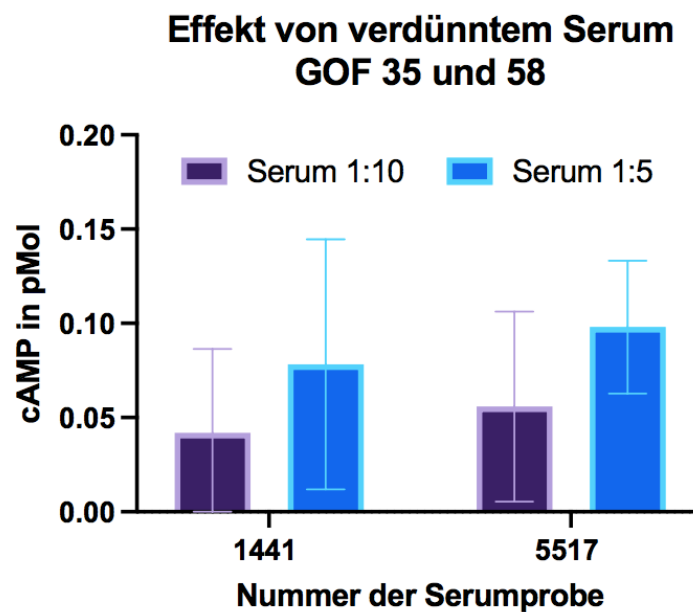


Abb. 33: Effekte von verdünntem Serum der Proben 1441 (TRAK = 0,5 IU/l) und 5517 (TRAK = 1226 IU/l) nach 30 Minuten.

4.3.2. Vergleich der Stimulationsfähigkeit von frischem und kryokonserviertem Gewebe

Im folgenden Diagramm wird ein Vergleich zwischen den Messungen in frischem und kryokonserviertem Gewebe ermöglicht. Zum Vergleich wurde die Stimulationszeit von jeweils zwei und vier Stunden gewählt. Es ergibt sich $n=4$. Für die Auswertung wurde Serum und IgG von Spender 1248 ausgewählt.

Für Forskolin ($p=0,029$) und M22 ($p=0,029$) konnten im frischen Gewebe signifikant höhere cAMP-Ausschläge erzielt werden. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen frischem und kryokonserviertem Gewebe in der Serum- ($p=0,343$) und IgG ($p=0,886$) Stimulation.

Forskolin konnte im kryokonserviertem Gewebe ($\bar{x}=1,585$) ein deutlich stärkeres Signal als im frischen Gewebe ($\bar{x}=0,623$) erzielen. Die Differenz zwischen Serum frisch ($\bar{x}=1,343$) zu kryokonserviert ($\bar{x}=1,103$) fiel dabei weniger deutlich aus. M22 erzielt im frischen Gewebe ($\bar{x}=0,159$) sowie im kryokonservierten Gewebe ($\bar{x}=0,03$) nur einen sehr geringen Ausschlag. Gleiches gilt für IgG in frischem Gewebe ($\bar{x}=0,155$) und kryokonserviertem Gewebe ($\bar{x}=0,209$).

Es muss berücksichtigt werden, dass für die Ergebnisse jeweils nur ein GOF-Donator untersucht wurde (kryokonserviertes Gewebe GOF 35, frisches Gewebe GOF 58).

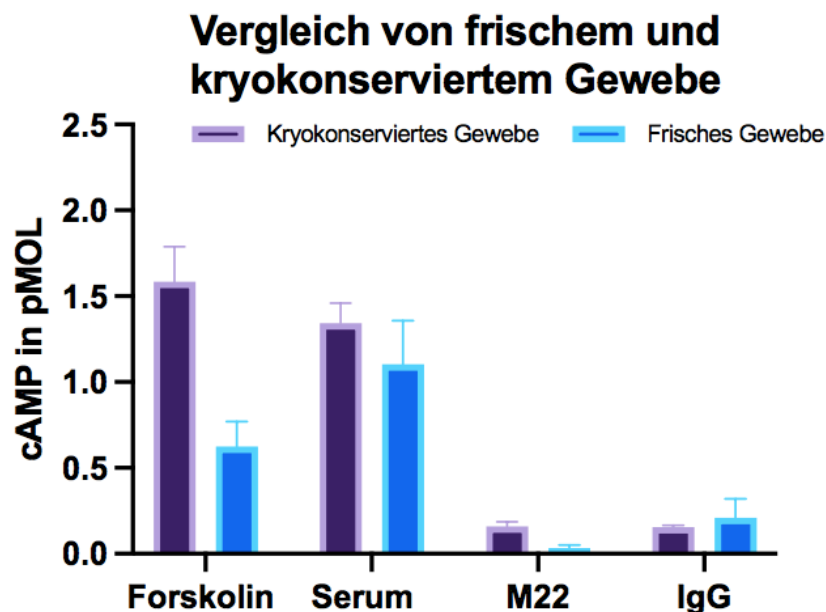


Abb. 34: Vergleich der Stimulationsfähigkeit von frischem und kryokonserviertem Gewebe. [c] Forskolin = 200 μMol , [c] M22 = 0,0001 $\mu\text{g/ml}$, [c] IgG = 1000 $\mu\text{g/ml}$

4.3.3. Vergleich des Messzeitpunktes im cAMP-Assay

Im Vordergrund stand eine Veri- bzw. Falsifizierung der Herstellerempfehlung, welche eine Messung nach 30 Minuten empfiehlt bzw. der These, dass mit zunehmender Inkubation der Substrat/Enhancer Lösung bessere Ergebnisse erzielt werden können. Nach Inkubation der Substrat/Enhancer Lösung, was dem letzten Schritt des Assay-Protokolls entspricht, folgt die Messung der RLU's mittels des Tecan Infinite M200 Absorptionsreader. Der Versuch wurde an GOF 35 sowie GOF 58 durchgeführt (n=4).

Weder im Vergleich von Forskolin ($p=0,490$), Serum ($p=0,886$), M22 ($p=0,886$) noch IgG ($p=0,343$) konnten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Messzeitpunkten festgestellt werden.

Verdeutlich werden die Ergebnisse durch den Vergleich der Mittelwerte. Forskolin 30min ($\bar{x}=1,323$) vs 60min ($\bar{x}=1,420$), Serum 30min ($\bar{x}=1,443$) vs 60min ($\bar{x}=1,422$), M22 30min ($\bar{x}=0,132$) vs 60min ($\bar{x}=0,139$) und IgG 30min ($\bar{x}=0,240$) vs 60min ($\bar{x}=0,212$).

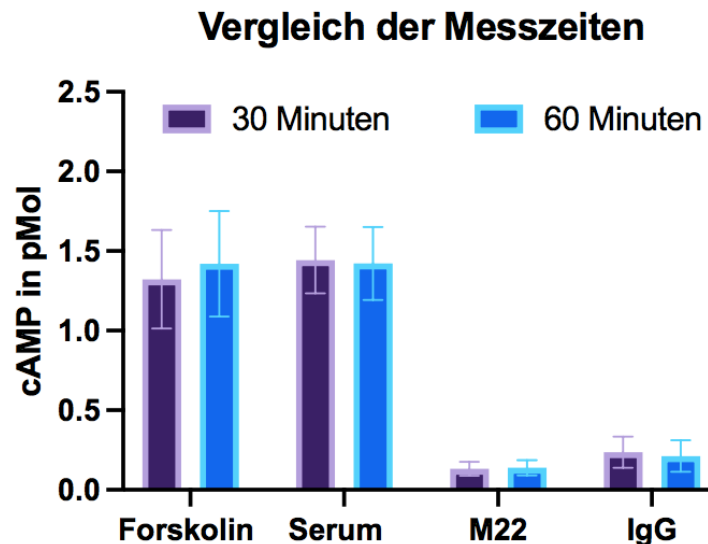


Abb. 35: Vergleich der Messzeiten im cAMP-Assay. [c] Forskolin = 200 μMol , [c] M22 = 0,0001 $\mu\text{g/ml}$, [c] IgG = 1000 $\mu\text{g/ml}$

4.3.4. Vergleich der Stimulationszeiten im cAMP-Assay

Die unter 4.3.1. aufgeführten Ergebnisse vergleichen die Stimulanzen untereinander. Unter diesem Punkt werden die Stimulationszeiten von zwei Stunden und vier Stunden miteinander verglichen. Es wurden die Ergebnisse beider GOF-Kulturen (35 und 58) und Serum- bzw. IgG-Probe 1248 eingeschlossen. Somit ergibt sich $n=4$.

Der Unterschied zwischen einer zwei- bzw. vierstündigen Stimulation ist im Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant für Forskolin ($p=0,486$), Serum ($p=0,2$), M22 ($p=0,314$) sowie IgG ($p=0,999$).

Die Mittelwerte zeigen unterschiedlich starke Abweichungen voneinander. Forskolin 2h ($\bar{x}=1,323$) vs 4h ($\bar{x}=0,885$), Serum 2h ($\bar{x}=1,443$) vs 4h ($\bar{x}=1,003$), M22 2h ($\bar{x}=0,132$)

vs 4h ($\bar{x}=0,058$) und IgG 2h ($\bar{x}=0,24$) vs 4h ($\bar{x}=0,126$). Mit den zweistündigen Stimulationen konnten durchgehend höhere Ausschläge erzielt werden.

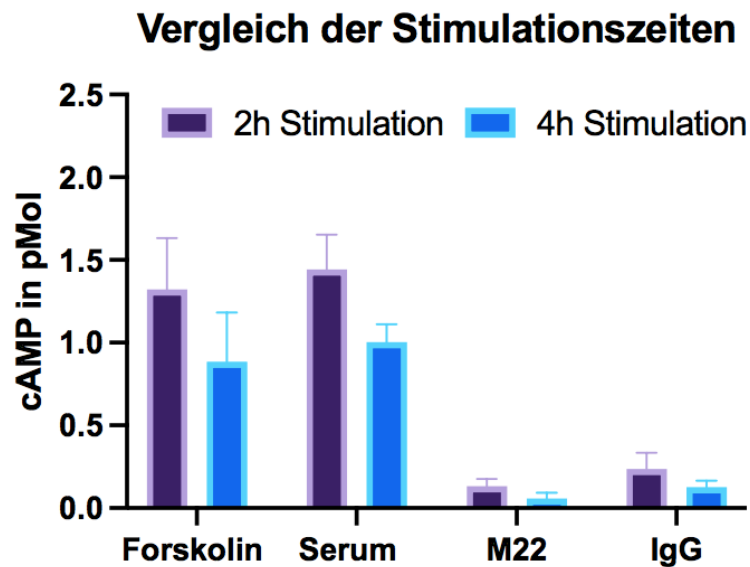


Abb. 36: Vergleich der Stimulationszeiten im cAMP-Assay. [c] von M22 = 0,0001 µg/ml, [c] von Forskolin = 200 µMol, [c] IgG = 1000 µg/ml

4.3.5. Vergleich der Patientenseren und der daraus isolierten Immunglobuline der Klasse G

Bei allen Serumspendern lag ein Morbus Basedow als Grunderkrankung vor. Die Gesamtmenge der Immunglobuline der Klasse G, die mittels Melon Gel IgG Spin Purification Kit isoliert werden konnten, sowie die anteilige TRAK-Konzentration, welche ebenfalls bestimmt wurde, unterschieden sich. In Serum 1248 (weiblich, TRAK unbekannt) betrug die IgG-Gesamtmenge 4,4 mg/ml, in Serum 1441 (weiblich, TRAK = 0,5 IU/l) wurden 5,5 mg/ml Gesamt-IgG festgestellt, für 7976 (männlich, TRAK = 26,63 IU/l) konnten 1,9 mg/ml und für 8072 (weiblich, TRAK = 11,7 IU/l) der Wert von 3,2 mg/ml Gesamtimmunglobulin gemessen werden. Das Experiment wurde an den GOF von Patient 35 sowie 58 durchgeführt, gezeigt sind die kumulativen Ergebnisse (n=4).

Da in Serum 7976 ($\bar{x}=1,443$) die geringste Gesamt-IgG Konzentration gemessen wurde, dient es in der Folge als Referenz. Serum 1248 ($p=0,2$ und $\bar{x}=1,270$), 1441 ($p=0,029$ und $\bar{x}=1,769$) und 8072 ($p=0,029$ und $\bar{x}=1,233$) erzielten trotz höherer Gesamt-IgG geringere cAMP-Ausschläge. Jedoch findet sich in Serum 7976 die

höchste TRAK-Konzentration, es erreicht signifikant höhere Stimulationswerte gegenüber Serum 1441 und 8072.

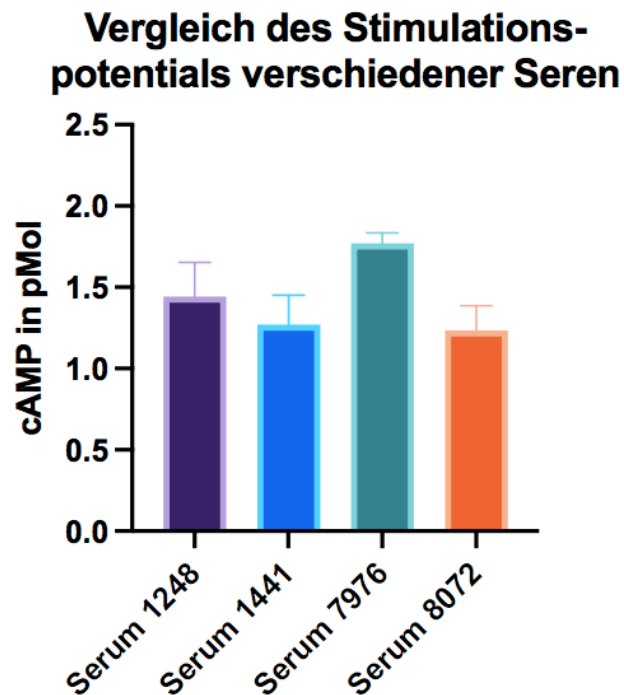


Abb. 37: Vergleich der Stimulationspotentiale von Seren mit unterschiedlichen Gesamt-IgG-Konzentrationen.

Mittels photometrischer Verfahren wurde die isolierte Gesamt-IgG-Konzentration bestimmt. Anschließend wurde für jede Probe im Reaktionspuffer Stimulationslösung der Konzentration 0,0001 $\mu\text{g/ml}$ erstellt. Die Gesamtmenge an Immunglobulinen der Klasse G blieb somit Proben übergreifend konstant. Der Anteil an spezifischen TRAK unterschied sich jedoch. Das Experiment wurde an den GOF-Kulturen 35 und 58 ($n=4$) durchgeführt.

Vergleicht man M22 ($\bar{x}=0,144$) mit den IgG-Stimulationen von Spender*in 1248 ($p=0,886$ und $\bar{x}=0,237$), 1441 ($p=0,886$ und $\bar{x}=0,123$) und 7976 ($p=0,886$ und $\bar{x}=0,173$), so ergibt es im Mann-Whitney-U-Test kein signifikantes Ergebnis. M22 erreicht jedoch signifikant höhere Ergebnisse als IgG 8072 ($p=0,029$ und $\bar{x}=0,013$).

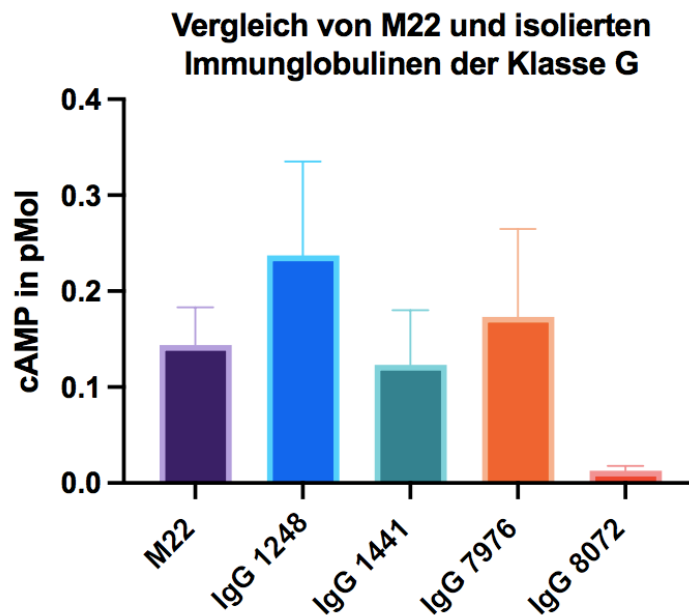


Abb. 38: Vergleich der Stimulation von Immunglobulinen unterschiedlicher Spender. [c] von M22 = 0,0001 µg/ml, [c] IgG = 1000 µg/ml

4.3.6. Messung aus Überstand, Lysat und deren Kombination

Die Herstellerangaben des von uns verwendeten cAMP-Screen System von Applied Biosystems (USA) empfehlen die Bestimmung von cAMP im Zelllysats. Jedoch findet sich in der Literatur auch die Messung im Überstand (van Zeijl et al. 2010; van Zeijl et al. 2012). Der folgende Versuch soll einen Überblick über die quantitativen Unterschiede der cAMP-Konzentration in Lysat und Überstand nach 30 Minuten Stimulation mit Forskolin bzw. Patientenserum aufzuzeigen. Die Abbildung (Abb. 38) zeigt erneut die kumulativen Ergebnisse für GOF-Kultur 35 und 58 (n=4).

Vergleicht man die vom Hersteller empfohlene Messung des Zelllysats mit der Messung aus dem Überstand, so ergibt sich weder für Forskolin ($p=0,2$ und $\bar{x}=1,969$ vs $\bar{x}=0,916$) noch für das Serum ($p=0,486$ und $\bar{x}=0,152$ zu $\bar{x}=0,666$) ein signifikanter Unterschied der Messmethoden. Im Vergleich zwischen Lysat und Kombinationsmessung (Überstand + Lysat) kann für Forskolin ($p=0,029$ und $\bar{x}=1,969$ vs $\bar{x}=1,730$) ein signifikant besseres Ergebnis im Lysat, jedoch für das Serum ($p=0,999$ und $\bar{x}=0,152$ vs $\bar{x}=0,638$) keine signifikant überlegene Methode ermittelt werden.

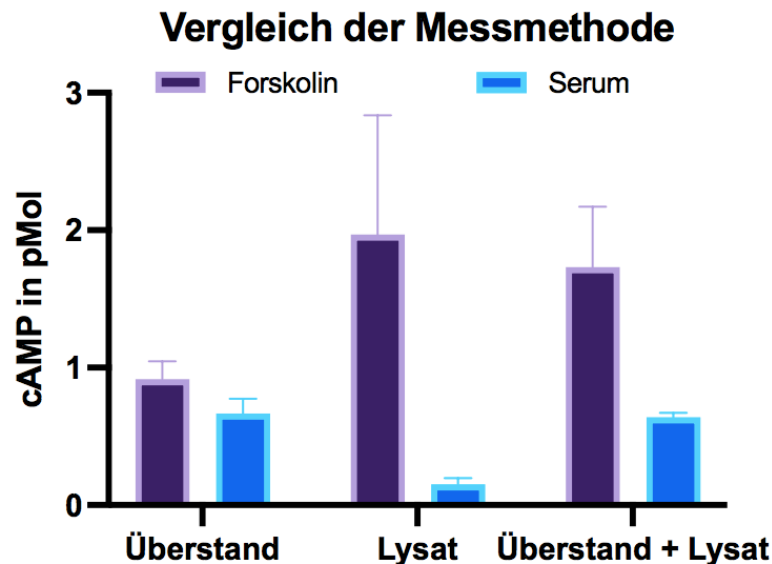


Abb. 39: Vergleich der Messungen in Überstand, Lysat und der Kombination aus Überstand und Lysat. [c] Forskolin = 200 μ Mol

4.3.7. Auswirkung einer Verdünnungsreihe von M22

Um den Einfluss der M22 Konzentration im oben beschriebenen Modell zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Verdünnungsreihen des stimulierenden Antikörpers erstellt. M22 wurde dabei zum einen in Reaktionspuffer (beide Verdünnungsreihen), zum anderen in Patientenserum (nur in Verdünnungsreihe 4000 ng/ml bis 0,02 ng/ml) gelöst. Es wurde die GOF-Kultur 35 (18,18 ng/ml bis 0,0012 ng/ml) bzw. GOF-Kultur 72 (4000 ng/ml bis 0,02 ng/ml) in Passage 3 verwendet. Die Stimulationszeit betrug 30 Minuten.

Im Kruskal-Wallis-Test blieb die M22 Verdünnungsreihe von 18,18 ng/ml bis 0,0012 ng/ml im Reaktionspuffer mit einem p-Wert von 0,37 nicht signifikant (Abb. siehe Anhang Kapitel 8). Die Verdünnungsreihe von 4000 ng/ml bis 0,02 ng/ml (siehe Abb. 40 linker Teil) blieb im Reaktionspuffer ebenfalls nicht signifikant ($p=0,20$). Wurde M22 jedoch im Serum verdünnt (siehe Abb. 40 rechter Teil), konnte ein signifikantes Ergebnis erzielt werden ($p=0,04$). Aufgrund der kleinen Fallzahl (jeweils $n=2$) sollte jedoch die eingeschränkte Aussagekraft der p-Werte berücksichtigt werden und der Vergleich der Mittelwerte im Vordergrund stehen.

In der Verdünnungsreihe des Reaktionspuffers ist der Effekt der von links nach rechts abnehmenden M22-Konzentration weniger deutlich. Daneben liegen die Mittelwerte

der Messwerte der 4000 ng/ml, 1000 ng/ml und der 12,5 ng/ml Stimulation sichtlich außerhalb der kontinuierlichen Signalabnahme. Zwischen 100 ng/ml und 0,19 ng/ml stagniert der das cAMP-Signal. Dagegen kommt es in der Stimulation in Normalserum lediglich zu zwei Messwerten, welche nicht im kontinuierlichen Verhältnis zur Konzentrationsabnahme stehen.

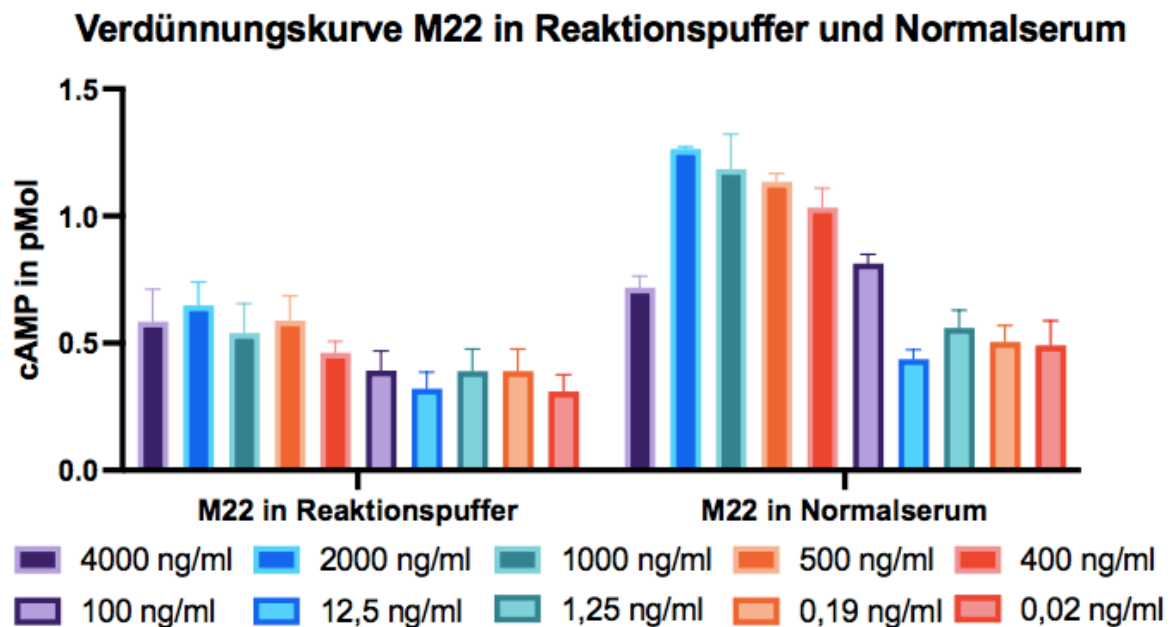


Abb. 40: Verdünnungsreihe 4000 ng/ml bis 0,02 ng/ml des monoklonalen TSHR-Antikörpers M22.

4.3.8. Bestimmung inhibitorischer Potentiale

Zuletzt wurden die inhibitorischen Potentiale von SYD5115/2, SYD1890/4, Org 274179-0 und K1-70 bestimmt. Bei SYD5115/2, SYD1890/4 und Org 274179-0 handelt es sich um low molecular weight (LMW) Compounds, welche uns von dem niederländischen Pharmaunternehmen Byondis (Nijmegen, NL) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Zum Vergleich und als Referenz dienten die inhibitorischen Werte, die mit K1-70, einem vollständig blockierenden monoklonalen Antikörper, erzielt werden konnten. Neben der bereits in 4.3. beschriebenen Vorinkubation von IBMX wurden bei den Inhibitionsversuchen auch die inhibitorischen Substanzen 3 Minuten vorinkubiert. Die anschließende Stimulation wurde mit 1,6 ng/ml M22 (mit Ausnahme von 4.3.8.4.2.) durchgeführt. Die Konzentration von M22 entspricht der doppelten EC=80 von M22 in Reaktionspuffer, welche laborintern in einem TBI Bioassay bestimmt werden konnte. Die Inhibitoren SYD5115/2, SYD1890/4 und Org 274179-0 wurden in DMSO gelöst und in Reaktionspuffer verdünnt. Die Verdünnungsschemata

(siehe 3.2.8.) zeigen das Vorgehen der zur Herstellung der unten gezeigten Konzentrationen. K1-70 wurde in Reaktionspuffer verdünnt. Das Ziel der nachfolgenden Ergebnisse war eine Eignungsprüfung des GOF-Versuchaufbaus, um die dosisabhängige Beziehung der verschiedenen Inhibition darzustellen.

4.3.8.1. Inhibition mit K1-70

Der vollständig blockierende monoklonale Antikörper K1-70 konnte in den eingesetzten GOF-Kulturen von Patient 35, 58 und 72 (n=6) in einer Verdünnungsreihe von 363,63 ng/ml bis 1,42 ng/ml im Kruskal-Wallis-Test kein signifikantes Ergebnis erzielen ($p=0,141$).

Es kommt zu einem konstanten Anstieg der Mittelwerte. Das Messsignal liegt allerdings kontinuierlich unterhalb der 0,2 pMol Grenze, wobei berücksichtigt werden muss, dass es sich beim monoklonalen Antikörper K1-70 um einen vollständig blockierenden und somit sehr starken Inhibitor des TSH-Rezeptors handelt.

Den weiteren Messungen, welche unter 1,6 ng/ml M22 Stimulation und mittels gleicher GOF-Gewebespende bzw. in gleicher Passage (Passage 3) erfolgten, können die in Abb. 41 erhobenen Daten als somit als Referenz zu einem gut beschriebenen Inhibitor dienen.

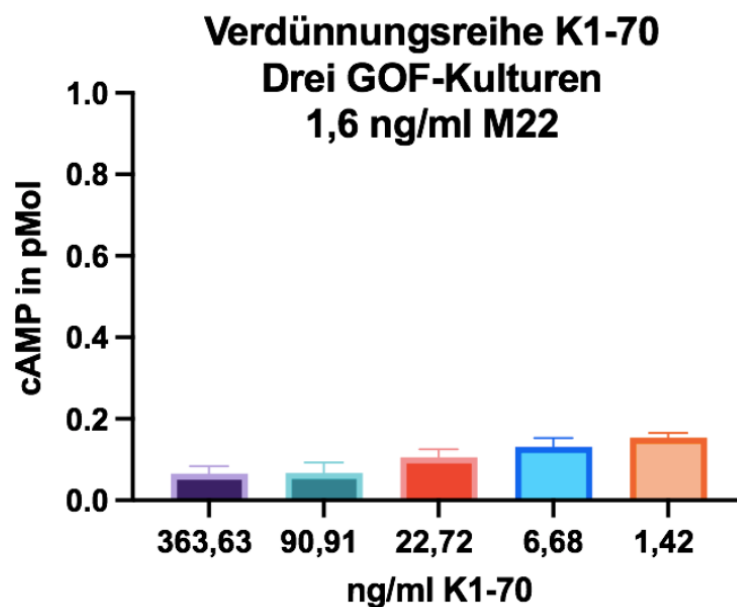


Abb. 41: Verdünnungsreihe K1-70 im cAMP-Assay.

4.3.8.2. Inhibition mit Org 274179-0

Auch LMW Compound Org 274179-0 konnte in der nicht-parametrischen Analyse des Kruskal-Wallis Test in den GOF-Kulturen 35, 58 und 72 (n=6) zunächst kein signifikantes Ergebnis erzielen (p=0,409).

In der Verdünnungsreihe von Org 274179-0 erreichen die Mittelwerte der Messwerte nur sehr geringe Ausschläge. Die Inhibition mit 10.000 nMol Org 274179-0 zeigt höhere im arithmetischen Mittel höhere Werte als die Inhibition mit 1000 nMol oder 100 nMol. Jedoch konnte von 1000 nMol, über 100 nMol, 10 nMol und 1 nMol eine kontinuierliche Signalverstärkung gemessen werden.

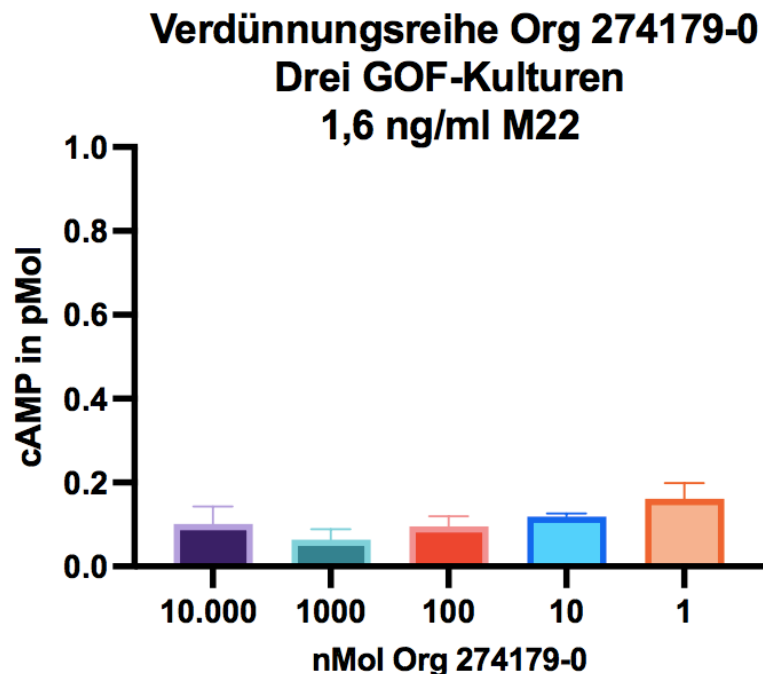


Abb. 42: Verdünnungsreihe Org 274179-0 im cAMP-Assay der 3. Passage.

4.3.8.3. Inhibition mit SYD1890/4 (Compound A)

In der Verdünnungsreihe von SYD1890/4 kann aufgrund des p-Werts von 0,11 nicht von einem signifikanten Unterschied gesprochen werden. Aufgrund der kleinen Fallzahl (n=2) sollte erneut die eingeschränkte Aussagekraft der p-Werte berücksichtigt werden und der Vergleich der Mittelwerte im Vordergrund stehen.

Insgesamt zeigt sich trotz geringer Fallzahl eine klare Tendenz des reziproken Anstiegs der cAMP-Werte. Dabei kommt während zwei Phasen zur Stagnation des

fortlaufenden Anstiegs. Lediglich die Messwerte von 0,316 nMol SYD1890/4 liegen außerhalb des Anstiegs. Neben der kleinen Fallzahl müssen jedoch auch die teilweise breiten Fehlerbalken (siehe z.B. 3,16 nMol) berücksichtigt werden.

Verdünnungskurve SYD1890/4 GOF 72 - 1,6 ng/ml M22

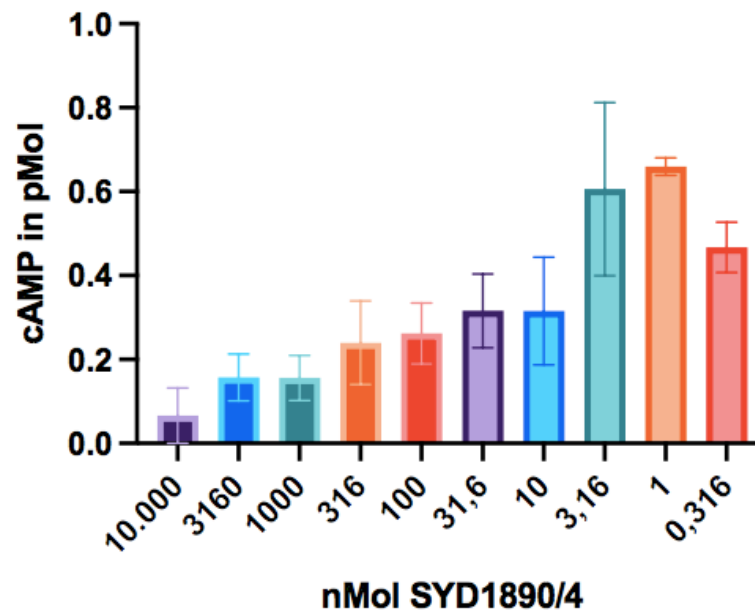


Abb. 43: Verdünnungsreihe SYD1890/4 in nachweislich nicht vorbehandelten Zellen der 3. Passage im cAMP-Assay.

4.3.8.4.1. Inhibition mit SYD5115/2 (Compound D) - 1,6 ng/ml M22

In den Stimulationsversuchen von SYD5115/2, welcher durch Vorversuche im laborinternen Bioassay als vielversprechender Wirkstoff-Kandidat ermittelt werden konnte, wurden jeweils mehrere GOF-Kulturen verglichen. Die GOF-Kulturen 35, 58 und 72 wurden in Passage 3 eingesetzt, wobei sich jedoch die Anzahl der Subkultivierungen unterschied. Die Zellen waren jedoch nicht älter als aus Subkultivierung 3, was einem gutem Viabilitätsniveau entspricht (siehe 4.2.). Die Gewebeprobe 35 und 72 wurden direkt nach Gewinnung in Kultur gebracht, Probe 58 wurde zwischenzeitlich kryokonserviert. Alle Gewebespende*rinnen litten unter Morbus Basedow und einer Endokrinen Orbitopathie und erhielten keine Vorbehandlung mit Immunsuppressiva.

Dargestellt ist die kumulative Auswertung der cAMP-Erhebungen aus allen drei Kulturen. Mit einem p-Wert von 0,46 blieb der Anstieg bei abnehmender Konzentration des Inhibitors im Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant. n=6.

Insgesamt lässt sich erst am unteren Ende (zwischen 10 nMol und 0,316 nMol) der Konzentrationsspanne ein kontinuierlicher Anstieg der Mittelwerte feststellen. Zwischen 10.000 nMol und 100 nMol stagnieren die Werte auf einem konstanten Niveau, wobei der Mittelwert der 316 nMol Inhibition deutlich unter den Mittelwerten der Nachbarkonzentrationen liegt.

Im Folgenden ist die kumulative Auswertung von sechs GOF-Kulturen in Passage 1 und Subkultivierung 1 zu sehen. Dabei handelte es sich stets um Gewebe, was umgehend nach seiner Gewinnung in Kultur überführt wurde. Alle Gewebespende*rinnen (Kultur 120, 145, 149, 155, 162, 165) litten unter einer Endokrinen Orbitopathie bei Morbus Basedow, der Status der Vorbehandlung ist dabei unbekannt. Zur Kontrolle wurde in diesem Versuchsaufbau nun auch der Hintergrundwert von cAMP bestimmt, welcher ganz ohne Stimulation vorliegt (siehe vorletzter Balken im Diagramm) Dabei handelt es sich lediglich um eine Veranschaulichung, die nicht in der statistischen Auswertung der abnehmenden Inhibitoren berücksichtigt wurde. Darüber hinaus wurden die Zellen auch ohne Zugabe von Inhibitor stimuliert (letzter Balken des Diagramms). Dieser Wert ist mit der Konzentration von 0 nMol SYD5115/2 gleichzusetzen. Die Ergebnisse sind im Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant ($p=0,23$). $n=12$.

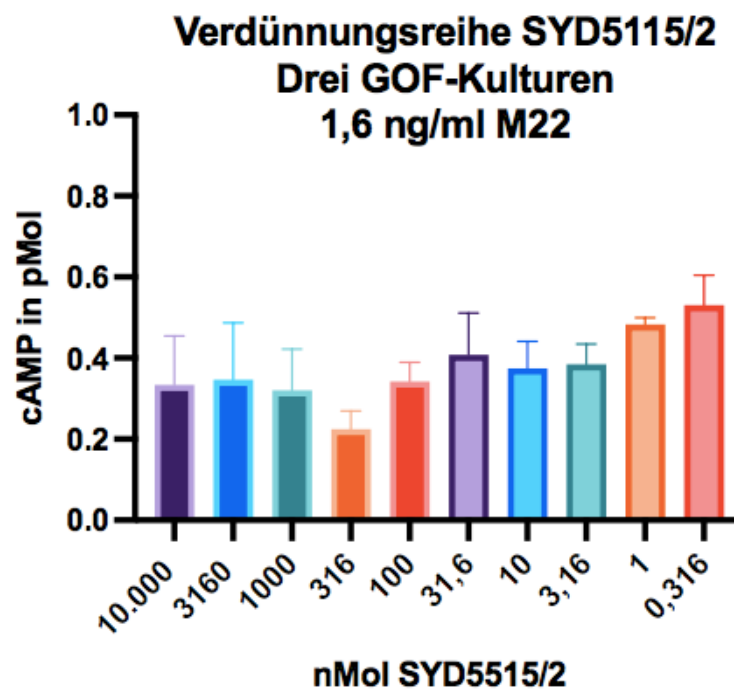


Abb. 44: Verdünnungsreihe SYD5115/2 in Zellen der 3. Passage im cAMP-Assay.

Trotz sehr hoher Inhibition mit 10.000 nMol SYD5115/2, ergibt sich für den entsprechenden Mittelwert den höchsten Ausschlag. Es ist in keinem Abschnitt des Diagramms eine Tendenz der Mittelwerte zu identifizieren.

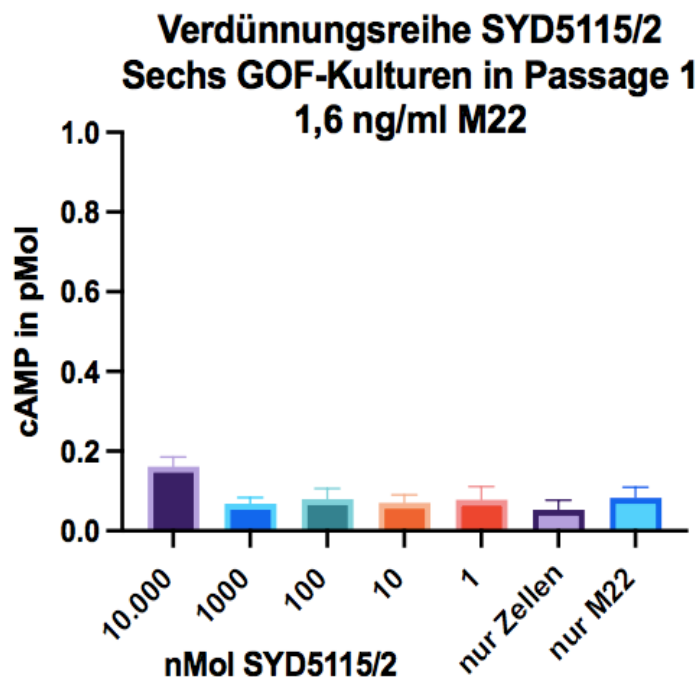


Abb. 45: Verdünnungsreihe SYD5115/2 in Zellen der 1. Passage im cAMP-Assay, stimuliert mit 1,6 ng/ml M22.

4.3.8.4.2. Inhibition mit SYD5115/2 (Compound D) - 10 ng/ml M22

Alle Versuchsbedingungen entsprechen der Beschreibung aus 4.3.8.4.1. Es kamen wieder die gleichen GOF-Kulturen zum Einsatz. Lediglich die eingesetzte Konzentration des stimulierenden Antikörpers M22 unterschied sich mit 10 ng/ml vom oben genannten Ablauf. Die Verdünnungsreihe konnte im Kruskal-Wallis-Test jedoch ebenfalls kein signifikantes Ergebnis erzielen ($p=0,454$). $n=12$. „Nur M22“ ist erneut der Konzentration von 0 nMol SYD5115/2 gleichzusetzen.

Die durch 10 ng/ml M22 generierten cAMP-Ausschläge liegen jedoch über die gesamte Messreihe hinweg weit über den Werten des 1,6 ng/ml Stimulation der selbigen Gewebespender. Nur für den unteren Abschnitt der Messreihe (100 nMol über 10 nMol bis 1 nMol) zeigt sich eine tendenzielle Zunahme der cAMP-Werte. Für die Stimulation ohne Inhibitor („nur M22“) liegen die Messwerte jedoch wieder

unterhalb der Messungen welche eine inhibitorische SYD5115/2 Komponente enthielten. Bei einigen Messungen zeigt sich ein breiter Fehlerbalken.

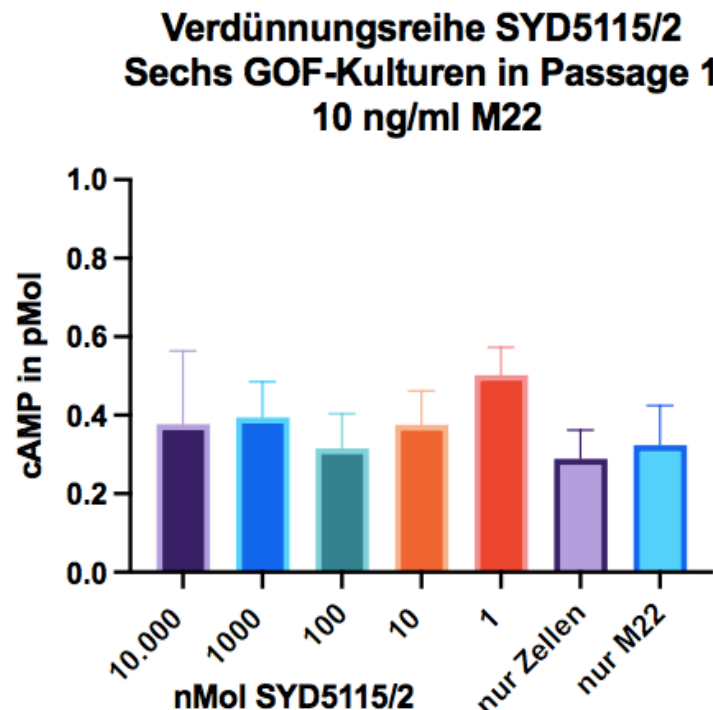


Abb. 46: Verdünnungsreihe SYD5115/2 in Zellen der 1. Passage im cAMP-Assay, stimuliert mit 10 ng/ml M22.

4.4. GOF Stimations- und Inhibitionsversuche im HA-Assay

Im Vordergrund stand die Bestimmung der inhibitorischen Potentiale von SYD5115/2, Org 274179-0 und K1-70. Zur Etablierung eines zuverlässigen und aussagekräftigen Versuchsprotokolls wurden zahlreiche Einflussgrößen wie die Zellzahl der GOF, die Konzentration von M22 oder die Stimulationszeit variiert. Somit dienten die HA-Versuche zunächst zur Findung geeigneter Begebenheiten, zum anderen jedoch zur Untermauerung der Aussage der cAMP-Ergebnisse.

Bei SYD5115/2 und Org 274179-0 handelt es sich um low molecular weight (LMW) Compounds, welche uns von dem niederländischen Pharmaunternehmen Byondis (Nijmegen, NL) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Zum Vergleich und als Referenz diente in der 48h und 24h Stimulation K1-70, ein vollständig blockierender monoklonaler Antikörper.

4.4.1. Variation von GOF-Zellzahl und Stimulationszeit im HA-Assay

Für den folgenden Versuchsaufbau wurden 10.000 (48h) bzw. 7000 (24h und 6h) GOF/96-Well in Passage 3 (2. Subkultivierung) verwendet. Die aufgeführten Konzentrationen der Inhibitoren wurden in Duplikaten gemessen. Es kamen jeweils zwei GOF Kulturen zum Einsatz. Bei beiden Patient*innen bestand eine Endokrine Orbitopathie bei M. Basedow.

Die LMW Compounds wurden in DMSO gelöst und in Reaktionspuffer verdünnt. Die Verdünnungs-schemata (siehe Material und Methoden) zeigen das Vorgehen der Herstellung der unten gezeigten Konzentrationen. Das Gemisch aus Inhibitor und Reaktionspuffer wurde zur Vorinkubation 30 Minuten vor Zugabe des monoklonalen Antikörpers M22 in die Wells pipettiert.

4.4.1.1. Nach 48h Stimulation mit 50 ng/ml M22

In allen drei Experimenten wurde die Nullhypothese im Kruskal-Wallis-Test bestätigt. Zwischen den Gruppen besteht somit kein Unterschied. Die p-Werte betragen $p=0,19$ (SYD5115/2), $p=0,14$ (Org 274179-0) und $p=0,91$ (K1-70). Auffällig sind die hohen HA-Ausschläge, welche z.T. 6000 ng/ml und mehr betragen. Jeweils $n=4$.

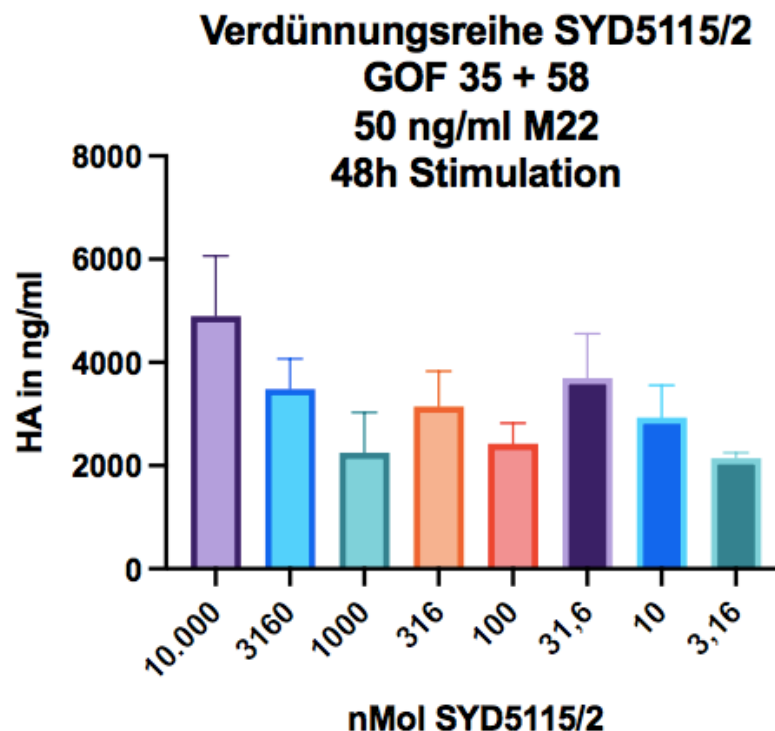


Abb. 47: Inhibitionsversuch SYD5115/2 im HA-Assay mit 10.000 Zellen und 48h M22 Inkubation.

In keinem Abschnitt des SYD5115/2 Diagramms lässt sich eine Tendenz der Messwerte ableiten. Trotz stärkster inhibitorischer Konzentration erreichen die Mittelwerte von 10.000 nMol SYD5115/2 die höchsten cAMP-Ausschläge. Am unteren Ende (3,16 nMOI SYD5115/2) konnten die geringsten Messwerte erhoben.

Auch in der nachfolgenden Verdünnungsreihe von Org 274179-0 lässt sich unter den beschriebenen Stimulationsbedingungen keine klare Tendenz der Messwerte ableiten. Die höchsten Messwerte konnten bei den höchsten Konzentrationen der Inhibitoren gemessen werden. Der geringste cAMP-Ausschlag fand sich am unteren Ende der inhibitorischen Verdünnungsreihe.

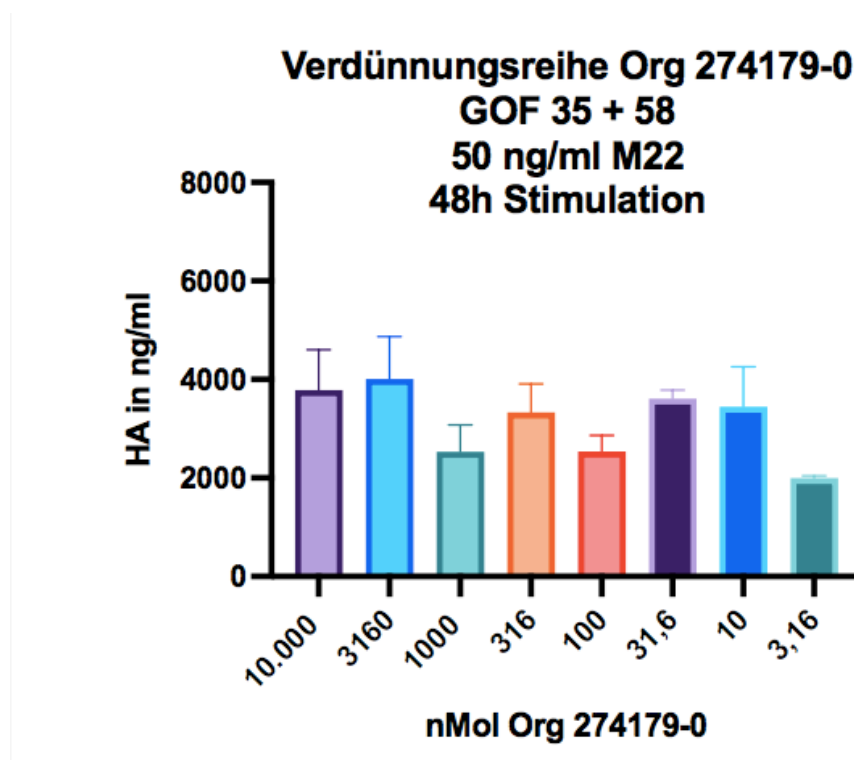


Abb. 48: Inhibitionsversuch Org 274179-0 im HA-Assay mit 10.000 Zellen und 48h M22 Inkubation.

Auch bei Inhibition mit K1-70, einem sehr starken Inhibitor lassen sich sehr hohe cAMP-Werte messen. Jedoch liegt findet sich bei der stärksten inhibitorischen Konzentration (90,91 ng/ml) auch der geringste cAMP-Ausschlag. In der Folge steigen die Werte bei reduzierter Konzentration des Inhibitors (11,36 ng/ml und 5,58 ng/ml) kontinuierlich an. Dagegen kommt es bei 22,72 ng/ml K1-70, einer mittelstarken Konzentration, zum höchsten Ausschlag der Messungen.

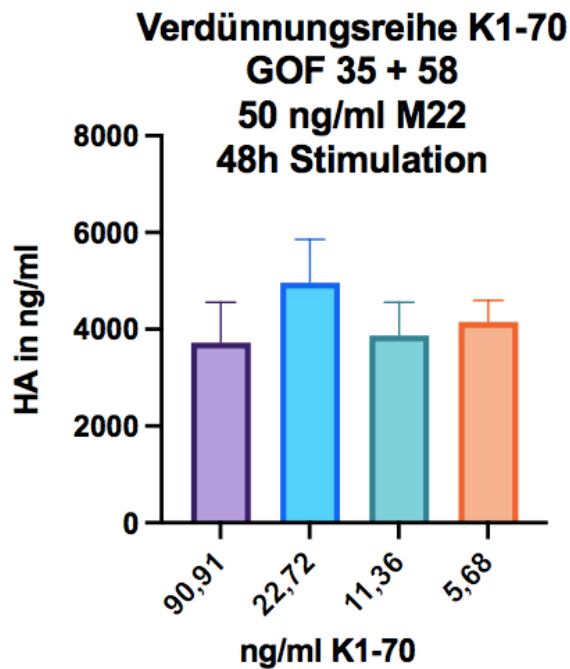


Abb. 49: Inhibitionsversuch K1-70 im HA-Assay mit 10.000 Zellen und 48h M22 Inkubation.

4.4.1.2. Nach 24h Stimulation mit 10 ng/ml M22

Zwischen den Gruppen der SYD5115/2 ($p=0,04$) und Org 274179-0 ($p=0,02$) Verdünnungsreihe konnte ein signifikanter Unterschied im Kruskal-Wallis-Test ermittelt werden. Der Unterschied in den beiden Verdünnungen von K1-70 ist im Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant ($p=0,33$). Für SYD5115/2 und Org 274179-0 gilt $n=4$, für K1-70 gilt $n=2$, weshalb die eingeschränkte Aussagekraft des p-Wert berücksichtigt werden muss und der Vergleich der Mittelwerte im Vordergrund steht.

Mit Ausnahme der Werte des 1000 nMol Balkens lässt sich zwischen 10.000 nMol und 10 nMol ein kontinuierlicher Anstieg der Messwerte beobachten. Die Messwerte liegen insgesamt deutlich unter den Werten der 48h Stimulation, welche jedoch auch mit der fünffachen Konzentration von M22 vollzogen wurde.

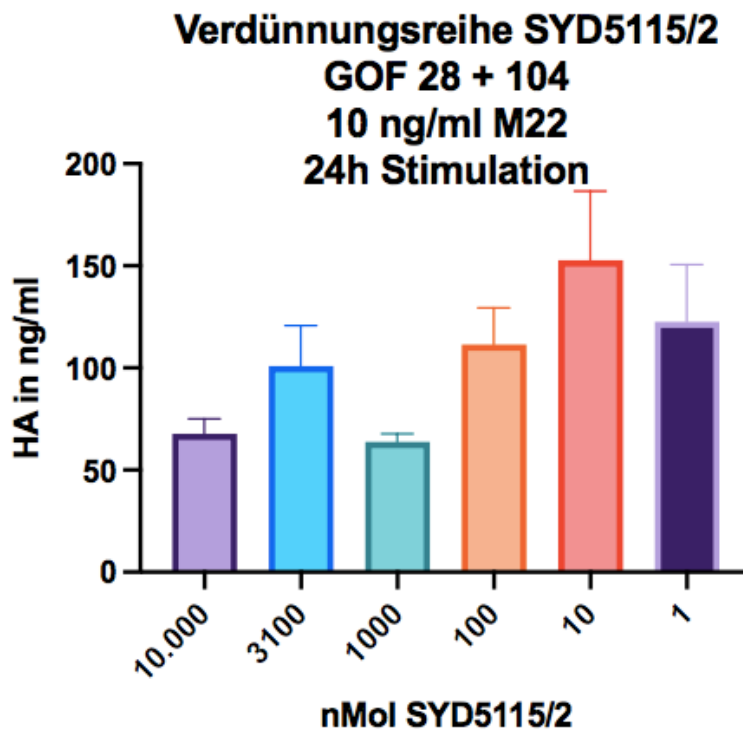


Abb. 50: Inhibitionsversuch SYD5115/2 im HA-Assay mit 7000 Zellen und 24h M22 Inkubation.

Zwischen 10.000 nMol und 100 nMol zeigt sich über drei abnehmende InhibitorKonzentration ein reziproker Anstieg des cAMP-Signals. Lediglich der Mittelwert von 1 nMol liegt leicht unterhalb von 100 nMol, somit nicht mehr im Trend.

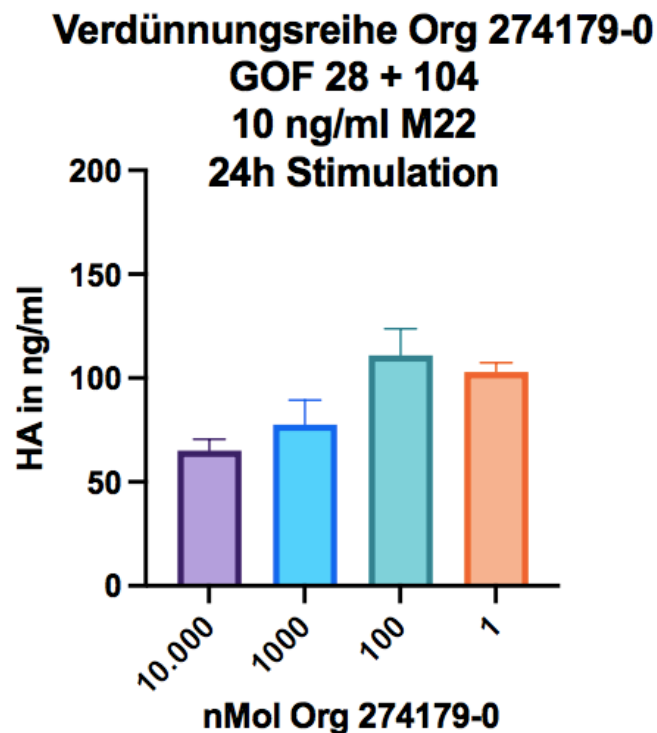


Abb. 51: Inhibitionsversuch Org 274179-0 im HA-Assay mit 7000 Zellen und 24h M22 Inkubation.

Es zeigen sich in beiden GOF-Kulturen bei der geringeren Konzentration des Inhibitors die höheren cAMP-Ausschläge. Jedoch können beide Konzentrationen von K1-70 nicht das inhibitorische Potential von Org 274179-0 oder SYD5115/2 erreichen, welche jedoch in einer anderen (nMol) Verdünnungsreihe titriert wurden.

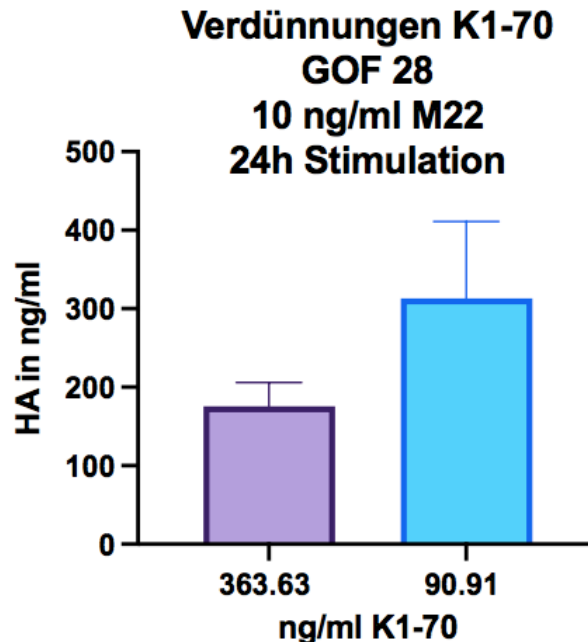


Abb. 52: Inhibitionsversuch K1-70 im HA-Assay mit 7000 Zellen und 24h M22 Inkubation.

4.4.1.3. Nach 6h Stimulation mit 10 ng/ml M22

Unter diesen Stimulationsbedingungen konnte kumulativ kein signifikanter Unterschied im Kruskal-Wallis-Test ermittelt werden. Die p-Werte betragen $p=0,793$ (SYD5115/2) und $p=0,38$ (Org 274179-0). $n=16$ für SYD5115/2, $n=4$ für Org 274179-0. Der Balken „nur Zellen“ ist der Konzentration von 0 nMol SYD5115/2 gleichzusetzen.

Nachdem die Messwerte zu Beginn konstant bleiben, lässt sich am unteren Ende der Verdünnungskurve ein Trend abzeichnen. Zwischen 100 nMol, 10 nMol, 1 nMol bis hin zur Stimulation ohne Inhibitor („nur M22“) zeigt sich ein progredienter Anstieg des cAMP-Signals.

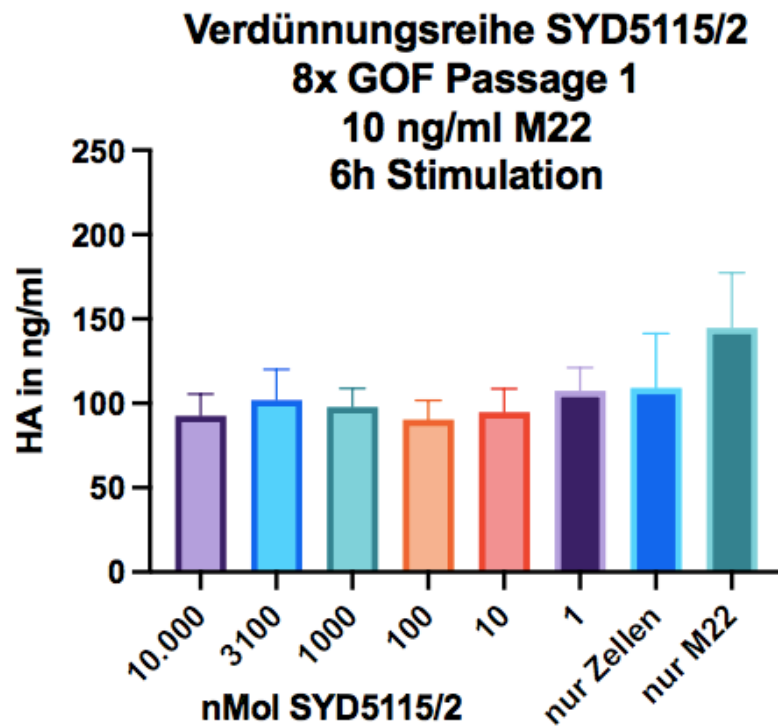


Abb. 53: Inhibitionsversuch SYD5115/2 im HA-Assay mit 7000 Zellen und 6h M22 Inkubation.

In dieser Messung zeigt sich zwischen 10.000 nMol, 1000 nMol und 100 nMol eine kontinuierliche Zunahme der cAMP-Signalstärke. Allerdings fällt das Signal am unteren Ende der Verdünnungsreihe (1 nMol) wieder ab. Zu berücksichtigen sind u.a. auch die großen Fehlerbalken der beiden niedrigen Konzentration des Inhibitors.

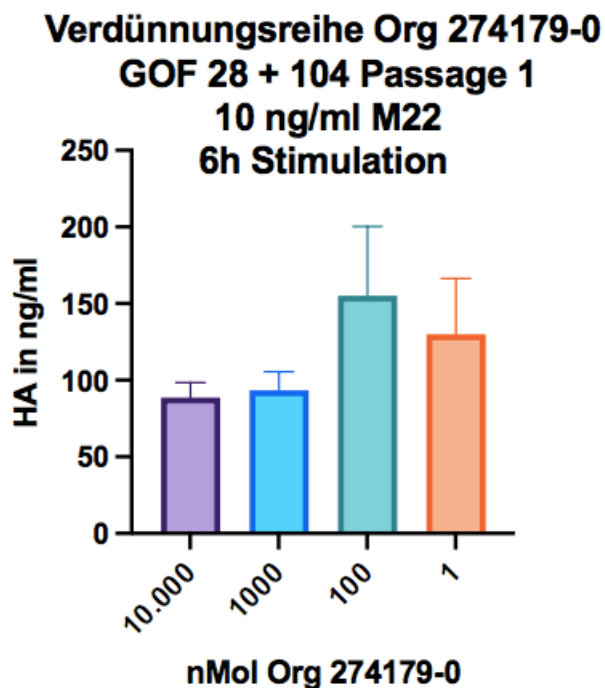


Abb. 54: Inhibitionsversuch Org 274179-0 im HA-Assay mit 7000 Zellen und 6h M22 Inkubation.

5. Diskussion

Das besondere Kollektiv der Gewebespende*r*innen mit Endokriner Orbitopathie ermöglicht dieser Arbeit eine detaillierte Beurteilung der *in vitro* Eigenschaften betroffener Fibroblasten. Auf der Basis dieser sehr realitätsnahen Abbildung pathophysiologischer Kaskaden, konnte ein weitaus besseres Verständnis des Stimulations-/Inhibitions geschens generiert werden. Wesentlicher Bestandteil war die Identifikation eines geeigneten Versuchsaufbaus mit einer exakten Beschreibung der Kultivierungs- und Assaybedingungen. Eine solch detaillierte Beschreibung des Versuchsaufbaus bzw. der unterschiedlichsten Variablen (Zellzahl, Stimulationszeit, Konzentrationen etc.) stellt ein Novum dar.

5.1. Auswahl orbitaler Fibroblasten

5.1.1. Verifizierung des Kultivierungsprotokolls

Die Fotodokumentation mit den abgebildeten Aufnahmen über die erfolgreiche Kultivierung orbitaler Fibroblasten untermauert den Erfolg der Ergänzungen bzw. Weiterentwicklungen im von Lisa Steiner erstelltem Protokoll zur Gewebekultivierung (Steiner, 2021). Dabei deckt sich die Beobachtung bzgl. der Wachstumsgeschwindigkeit orbitaler Fibroblasten ebenfalls mit den von ihr erhobenen Daten. Die Fotodokumentation (siehe 4.1.) zeigt auch die Differenzierung der Fibroblasten in Präadipozyten, welche jedoch nicht in allen Kulturen erreicht werden konnte. Von den 26 angelegten Kulturen wuchsen über 80% erfolgreich und konfluent an, sodass diese sich zur Subkultivierung und weiteren Schritten eigneten. In vier Kulturen konnte nach acht Wochen kein Wachstum erreicht werden, sodass die Petrischalen verworfen wurden. Ein detaillierter Vergleich des Kultivierungserfolges mit anderen Gruppen ist quasi nicht möglich, da diesbezüglich nur selten Daten aus den Publikationen hervorgehen.

5.1.2. Qualität der Fibroblasten im zeitlichen Verlauf

Um die Zellqualität im zeitlichen Verlauf zu bestimmen, wurden die Fibroblasten über einen Zeitraum von acht Monaten kultiviert. Der morphologische Vergleich der Basisplatten über einen Zeitraum von acht Monaten und somit im Verlauf über sechs Subkultivierungen reicht alleine jedoch nicht aus, um ein vollständiges Bild über die

Qualität der orbitalen Fibroblasten zu gewinnen. Zwar ist auch nach acht Monaten noch mit einem konfluenten Wachstum der Fibroblasten in der Petrischale zu rechnen, jedoch konnten im nachfolgenden MTT-Assay der verschiedenen Subkultivierungen deutliche Unterschiede der Viabilität gemessen werden. Insbesondere die späten Subkultivierungen zeigten einen deutlichen Verlust der Viabilität, was vermutlich durch die vergleichsweise schnelle Seneszenz der Zellen in Kultur bedingt ist (Hayflick, 1965). Zu berücksichtigen ist außerdem, dass nicht alle Kulturen über diesen langen Zeitraum erfolgreich zu kultivieren waren. Im MTT-Assay wurden die sechs Subkultivierungen von zwei GOF-Kulturen verglichen. Eine größere Fallzahl könnte den gezeigten Effekt des Viabilitätsverlustes verdeutlichen. Um den Erfolg von Anschlussexperimenten nicht zu gefährden, sollte stets auf junge Subkultivierungen mit hoher Stoffwechselaktivität vertraut werden.

5.1.3. Der Einfluss von Kollagenase auf das Zellwachstum

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Gewebe vor seiner Kultivierung zusätzlich einem Kollagenase-Verdau ausgesetzt und mit dem Vorgehen einer kollagenasefreien Kultivierung verglichen. Von Interesse war eine Aussage bzgl. des Einflusses der Kollagenase auf die aus den Gewebeproben zu gewinnende Zellzahl. Da mikroskopisch keine morphologischen Unterschiede erkennbar waren und die gewonnene Zellzahl der durch Kollagenase-Verdau angelegten Kulturen die Kontrollkulturen nur geringfügig übertraf, konnte der erhoffte Erfolg, die Zellen stärker aus ihrer Extrazellulärmatrix herauszulösen, in der kleinen Stichprobe nur bedingt erzielt werden. In Anbetracht der potentiellen Zellschädigung durch die Kollagenase sollte auf ein kollagenasefreies Protokoll vertraut werden (Pandamooz et al., 2012). Alternativ könnten die Verfahren in einem MTT-Assay verglichen werden, jedoch sollte dabei auch ein Vergleich einer Inkubation im Reaktionspuffer erfolgen, um den Fehler des fehlenden Mediums während des Kollagenase-Verdaus zu reduzieren.

5.1.4. Der Einfluss von Trypsin auf das Zellwachstum

Um Fibroblasten in eine nachfolgende Passage zu überführen, ist ein sogenanntes „Detachment“ erforderlich. Um den potenziell zellschädigenden Einfluss von Trypsin zu quantifizieren, wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Für das Detachment stehen neben dem hier verwendeten Trypsin verschiedene Substanzen, wie beispielsweise Accutase oder Kollagenase zur Verfügung, welche als Alternative in Erwägung

gezogen werden können. Die Ergebnisse zeigen, dass selbst nach 30-minütiger Trypsin-Einwirkung nicht alle Zellen vom Boden der Petrischale abgelöst wurden. Die anheftenden Zellkörper sind morphologisch ebenfalls erhalten, auch wenn der Überstand zunehmend eintrübt bzw. vermehrt mit abgelöst schwimmenden Zellen angereichert ist. Auch nach 30-minütiger Trypsin-Inkubation erreichen die Zellen nach ihrer Passagierung erneut ein konfluentes Wachstum. Im MTT-Assay zeigt sich nach drei, neun und 18 Minuten der Inkubation ein progredienter Viabilitätsverlust der Fibroblasten. Nach 30-minütiger Inkubation scheint der Effekt jedoch rückläufig zu sein. Möglicherweise ist dieser Effekt durch den Zerfall des Trypsins unter den Inkubationstemperaturen zu erklären (Venkatesh and Sundaram, 1998). Andererseits könnten die Fibroblasten Resistenzmechanismen entwickeln, um sich vor den toxischen Einflüssen des Trypsins zu schützen (Alberts et al., 2002). Zuvor sollten aber die Limitationen berücksichtigt werden. Das MTT-Assay wurde mit vergleichsweise älteren, zwischenzeitlich kryokonservierten Zellen durchgeführt, welche eine geringe Ausgangsviabilität zeigten. Die erhobenen Daten dienen somit vielmehr als erster Hinweis auf einen Viabilitätsverlust. Eine Verifizierung durch ein erneutes Assay mit jüngeren Zellen und einer größeren Stichprobe ist sinnvoll, ehe man Adjustationen im Protokoll vornimmt. Interessant sind dabei auch die Effekte der Accutase, insbesondere im Vergleich zu dem hier eingesetzten Trypsin.

5.1.5. Kryokonservierung von orbitalen Fibroblasten

Die Kultivierung von orbitalen Fibroblasten gelang aus frischem sowie kryokonservierten Orbitagewebe, wobei das verwendete Gewebe nie länger als sechs Monate eingefroren war. Lisa Steiner konnte im Vorfeld keine signifikanten Unterschiede zwischen frischem und kryokonservierten Gewebe bzgl. Wachstumsgeschwindigkeit und Stoffwechselaktivität feststellen (Steiner, 2021). Im Folgenden war von Interesse, wie sich die bereits kultivierten Fibroblasten an die Begebenheiten der Kryokonservierung anpassen können. Nach erfolgreicher Kultivierung und Passagierung, wurden die Fibroblasten von drei Gewebespender*innen in der 2. Passage für sechs, neun bzw. 12 Monate bei -80°C eingefroren und anschließend rekultiviert. Bei allen Kulturen gelang die anschließende Rekultivierung, sodass ein konfluentes Wachstum in einer Petrischale sowie einer 96-Well Platte erreicht werden konnte. Nach vier Tagen Rekultivierung wurden die konfluenten Zellen der 96-Well Platte einem MTT-Assay unterzogen, welcher den

Viabilitätsverlust unter Kryokonservierung verdeutlicht. Der bereits nach sechs Monaten eingetretene Viabilitätsverlust zeigt, dass nach Möglichkeit auf die Kryokonservation verzichtet werden sollte. Unbeantwortet bleibt jedoch die Frage, ob der Vorgang der Kryokonservierung mit Trypsinierung oder die thermischen Begebenheiten den Verlust bedingen. Klären könnte dies ein MTT-Assay, welches die Zellen nach nur sehr kurzer Verweildauer in Kryokonservierung untersucht. Da die Ergebnisse der Stimulationsversuche jedoch keinen Hinweis auf den Viabilitätsverlust zeigen, sollte man die Zellen ggf. zunächst in einer Petrischale rekultivieren, um ihnen somit genügend Zeit zu verschaffen, ihren Stoffwechsel zu erhöhen. Ein MTT-Assay nach potentiell erfolgter Regeneration könnte Aufschluss geben und die ähnlichen Ergebnisse der Stimulationsversuche erklären.

5.1.6. Zellwachstum in 96-Well Platte

Da sich in 96-Well Platten mit einer geringen Zellzahl arbeiten lässt, kann jede Kultur auf weitaus mehr Variablen untersucht werden, als dies in größeren Kulturgefäßen der Fall ist. Daher stellte sich die Frage nach Eignung von 96-Well Platten für Stimulations- und Inhibitionsversuche.

Auch in einer 96-Well Platte gelang die Passagierung und Kultivierung orbitaler Fibroblasten. Nach spätestens vier Tagen zeigte sich bei einer Aussaat von 10.000 Zellen ein konfluentes Wachstum, welches in der Fotodokumentation gezeigt wird. Nur selten und sehr vereinzelt, kam es zu keinem konfluenten Wachstum. Dennoch ist es von großer Bedeutung, dass jedes einzelne Well vor weiteren Versuchen einer mikroskopischen Kontrolle unterzogen wird. Die visuelle/mikroskopische Begutachtung bzw. fotografische Aufnahmen sind in 96-Well Platten erschwert, da sich Feuchtigkeit an der Plastikabdeckung verstärkt absetzt, was in teilweise unscharfen Aufnahmen resultiert. Nichtsdestotrotz sollte die Dokumentation obligat erfolgen. Die direkte Stimulation der Zellen in einer 96-Well Platte konnte in den nachfolgend beschriebenen Stimulationsversuchen erfolgreich durchgeführt werden. Bislang finden sich in der Literatur vor allem Stimulationen in 24-Well Platten von Marcinkowski et al. oder gar in 6-Well Platten, welche z.B. von Valyasevi et al. durchgeführt wurden (Valyasevi et al., 1999; Marcinkowski et al., 2019). Die Stimulation in einer 96-Well Platte bietet jedoch den Vorteil, dass weniger Zellen eingesät werden müssen als dies in größeren Kulturgefäßen der Fall ist. Somit stehen durch diese zellsparende Methode

weitaus mehr Möglichkeiten für Folgeversuche mit den Zellen der gleichen Gewebespender*innen zur Verfügung. Dabei sollte jedoch untersucht werden, ob die Stimulationen in größeren Kulturgefäßen verlässliche Ergebnisse liefern. Zielführend wäre eine Verständigung auf gleiche Versuchsprotokolle, sodass der Vergleich einfacher gelingen kann.

5.2. Identifikation stimulatorischer Potentiale im cAMP-Assay

Das cAMP-Assay diente der Klärung entscheidender Fragen bzgl. des quantitativen Rezeptor-Ansprechens der orbitalen Fibroblasten auf unsere Stimulanzien. Dabei wurden unterschiedliche Stimulatoren herangezogen, das optimale zeitliche Stimulationspotential ermittelt und anschließend Verdünnungsreihen verschiedener Inhibitoren angefertigt, die auf ihr blockierendes Potenzial untersucht wurden.

Die höchsten cAMP-Ausschläge ließen sich in den Stimulationen mit Forskolin, welches in Reaktionspuffer gelöst wurde, und mittels Patient*innen-Serum erzielen. Dabei waren die zweistündigen Stimulationen den vierstündigen deutlich überlegen. Dieses ist trotz Vorinkubation von IBMX ggf. mit dem Zerfall des cAMP zu erklären. Die TRAK-Konzentration scheint bei Serumstimulationen eine untergeordnete Rolle zu spielen, da mutmaßlich co-stimulatorische Effekte des Serums die TRAK-induzierte cAMP-Bildung überdecken. Berücksichtigt man den von Reddy et al. beschriebenen Resistenzverlust der Monolayerschicht der Fibroblasten nach cAMP-Zugabe, so könnten die Unterschiede der Stimulationszeit auch auf eine zunehmende Zellschädigung zurückzuführen sein (Reddy et al. 1998).

Der monoklonale TSH-Rezeptorantikörper M22, welcher ebenfalls in Reaktionspuffer gelöst wurde, konnte unter gleichen Bedingungen nicht ansatzweise die stimulatorischen Sphären im cAMP-Ausschlag erreichen, wie dies unter Forskolin oder Serum zu beobachten war. Dennoch konnte mittels in Reaktionspuffer sowie Serum gelösten M22 eine dosisabhängige Wirkungskurve generiert werden. Dabei mussten jedoch höhere M22-Konzentrationen eingesetzt werden, als von Diana et al. in Wildtyp- und MC4-CHO-Zellen (Diana et al. 2020). Um die oben beschriebenen co-stimulatorischen Effekte von Serum oder Kulturmedien zu umgehen, sollten in kommenden Stimationsversuchen stets serumfreie Medien bzw. Reaktionspuffer als Trägersubstanz verwendet werden.

Auch die aus Patient*innen-Serum isolierten Immunglobuline der Klasse G erreichten nicht annähernd das Stimulationspotential, welches von Forskolin oder Serum ausging. Dabei lagen bei vereinzelt Proben die Stimulationswerte unter denen der Standardkurve, sodass diese nicht darzustellen waren. Betrachtet man die Ergebnisse der isolierten IgG-Stimulationen in verschiedenen GOF-Kulturen kumuliert, so konnten nur mittels Proben vereinzelter Spender*innen höhere cAMP-Werte erzielt werden, als dies durch die 1000-fach niedrigere M22-Konzentration gelang. Das stimulatorische Potential der isolierten Immunglobuline korreliert dabei nicht mit dem Potential der Ursprungs-Seren. Dies ist möglicherweise ein weiterer Hinweis, dass neben der TSH-Rezeptor Kaskade ein weiterer, TSHR unabhängiger Weg aktiviert wird. Da van Zeijl et al. nur in einem Drittel (4 von 12 Kulturen) einen cAMP Anstieg auf die Stimulation durch Immunglobuline nachweisen konnten, kann die Frage nur durch die Stimulation weiterer Kulturen beantwortet werden (van Zeijl et al. 2011). Das stimulatorische Potential von M22 liegt in Anbetracht der verfügbaren Daten deutlich über dem Potential der isolierten Immunglobuline, weshalb er sich besser für Stimulationen eignet. Des Weiteren ist von einer höheren Reproduzierbarkeit auszugehen, da die Patientenseren/-immunglobuline nur in begrenzten Umfang verfügbar sind.

Bei nachfolgenden Stimulationen wurde deshalb auf kürzere Inkubationszeiten vertraut und die Effekte von Serumverdünnungen untersucht, welche entsprechend der Erwartungen in niedrigeren cAMP- Ausschlägen resultierten. Die orbitalen Fibroblasten aus dem frischen Gewebe schnitten im Vergleich zu den Zellen aus kryokonserviertem Gewebe bei den Messungen (kumuliert) besser ab. Auch mit F-Medium konnte eine Stimulation von cAMP erreicht werden, was die Bedeutung einer serum- und mediumfreien Stimulation in Reaktionspuffer unterstreicht, da Wechselwirkungen durch stimulatorische Inhaltsstoffe nicht ausgeschlossen werden können. Sobald Reaktionspuffer anstatt Serum oder Medium als Trägermedium für stimulatorische Antikörper zum Einsatz kam, fielen die cAMP-Werte deutlich niedriger aus. Dies ist einerseits mit der deutlich reduzierten Stoffwechselaktivität der Fibroblasten im Reaktionspuffer zu erklären, andererseits aber ebenfalls durch die fehlende Co-Stimulation der Inhaltsstoffe des Serums oder Mediums möglich. Die Abweichungen der Stoffwechselaktivität wurde im MTT-Assay untersucht und ermöglicht somit ein klares Bild auf den Funktionsverlust der Zellen.

Daneben empfiehlt es sich, bei der Titrierung von M22 an der EC80 zu orientieren, welche im Vorfeld im Tyretain TSI Bioassay (Quidel, San Diego, CA, USA) bestimmt werden konnte. Die M22 Konzentration von 1,6 ng/ml (entspricht EC80) konnte durch LMW-Compounds in verschiedenen GOF-Kulturen teilweise in einer dosisabhängigen Beziehung inhibiert werden. Mit einer Konzentration von 10 ng/ml M22 gelang diese Inhibition nicht mehr. Dieser Effekt könnte durch eine Sättigung der Rezeptoren zu erklären sein, welche sich durch die hochkonzentrierte, fortlaufende Stimulation nicht im ausreichenden Maße inhibieren lassen. Darüber hinaus sollten die Compounds zeitgleich mit IBMX 30 Minuten vorinkubiert werden, ehe man den stimulierenden Antikörper hinzufügt, welcher die TSH-Rezeptoren besetzt.

Daraus ergibt sich, dass mit einer Zellzahl von 10.000 Fibroblasten/Well, 1,6 ng/ml M22, Reaktionspuffer als Trägermedium, 30-minütige Vorinkubation von IBMX und einer LMW-Compound Inkubation von weiteren 30 Minuten die besten Ergebnisse im cAMP-Assay erzielt werden konnten. Dabei empfiehlt es sich, sich an der Vorgehensweise von Neumann et al. zu orientieren, welche gepoolte GOF-Kulturen verwendeten, da sich deren Daten mit den Beobachtungen dieser Arbeit decken und verschiedene Kulturen nicht immer konstant auf die cAMP-Produktion reagieren (Neumann et al. 2010).

5.3. Erprobung inhibitorischer Verdünnungsreihen im HA-Assay

Da die Ergebnisse aus den cAMP-Assays die Frage nach der Potenz verschiedener Stimulatoren in umfassendem Maße erklären, wurde sich bei den HA-Messungen auf den Versuch beschränkt, zuverlässige Bedingungen für die Erprobung einer inhibitorischen Verdünnungsreihe zu schaffen. Da HA von den Fibroblasten erst nach Durchlauf des Pathways synthetisiert wird, wurden zunächst deutlich längere Stimulationszeiten gewählt. Vorversuche bzgl. der Stimulationszeit und Konzentration von M22, welche ohne zusätzliche Inhibitoren durchgeführt wurden, werden in der Dissertation von Lisa Steiner beschrieben. Entsprechend dieser Erfahrungen wurde eine 48-stündige Stimulationszeit gewählt, da daraus im Vergleich zur 24- und 6-stündigen Stimulationszeit bessere Ergebnisse hervorgingen (Steiner, 2021). Der Konzentration von M22 konnte dabei keine maßgebliche Bedeutung zugeschrieben werden, da sich die HA-Ausschläge nach Stimulation mit 50 ng/ml, 100 ng/ml oder 500 ng/ml nur unwesentlich unterschieden (Steiner, 2021).

Der Einsatz der Verdünnungsreihen verschiedener Inhibitoren zeigte jedoch unter 50 ng/ml M22 und 48-stündiger Inkubation keine dosisabhängige Beziehung. Dies könnte einerseits am verfrühten Zerfall des Inhibitors, andererseits durch die fehlende Vorinkubation der Inhibitoren im durchgeführten Experiment zu erklären sein könnte. Es wurden jedoch vergleichsweise hohe HA-Ausschläge erreicht (z.T. >6000 ng/ml), was sich aus der Wahl der 96-Well Platte bzw. der Saat von 10.000 Zellen ergeben könnte.

Nach Adjustierung von M22 auf 10 ng/ml, Vorinkubation der inhibitorischen Verdünnungsreihe, einer Stimulationszeit von 24h und der Aussaat von lediglich 7000 Zellen/Well konnten Messwerte erfasst werden, welche näher an den zu erwartenden Effekten lagen. Jedoch ließ sich weder mit SYD5115/2, noch mit Org 274179-0 oder K1-70 durchgängig eine dosisabhängige Beziehung feststellen. Dabei lagen die HA-Ausschläge wieder im Konzentrationsbereich der Experimente von Lisa Steiner, wobei der Vergleich durch Auswahl größerer Well-Platten nur schwer möglich ist. Da die 24-stündigen Versuche mit Fibroblasten anderer GOF-Spender*innen durchgeführt wurden, könnte dies auch die Kausalität bedingen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass der TSH-Rezeptor von 10ng/ml nicht gesättigt vorliegt, was sich einerseits aus der Differenz zu den 50ng/ml Stimulationen und andererseits aus der Literatur ergibt (Krieger et al., 2016).

Nach weiterer Verringerung der Inkubationsdauer auf lediglich sechs Stunden entsprachen die Ergebnisse am ehesten der zu erwartenden dosisabhängigen Beziehung. Da jedoch unter den Duplikatmessungen vereinzelt immer wieder ausreißende Schwankungen registriert wurden, ist eine große Stichprobe zu wählen, weil zu kleine Kollektive ein verzerrtes Bild darstellen. Eine vollständige Inhibition des M22 vermittelten HA-Signals, wie es Krieger und Gershengorn mit den von ihnen eingesetzten Rezeptorantagonisten erreichen, konnte weder mit den LMW Compounds noch mit K1-70 erzielt werden (Krieger and Gershengorn, 2014).

Zukünftig könnten kürzere Stimulationszeiten, beispielsweise von zwei oder vier Stunden und geringere M22-Konzentrationen die Ergebnisse noch eindrücklicher darstellen. Andererseits könnte eine Korrektur der Messwerte mit der Gesamtproteinmenge erfolgen, wie von van Zeijl et al. gezeigt, um den Einfluss von

abweichenden Zellmengen in den Wells zu untersuchen (van Zeijl et al., 2011). Auch wenn der Versuchsaufbau eine verlässliche Möglichkeit bietet, wird die Frage nach den optimalen Bedingungen nicht abschließend beantwortet.

5.4. Vergleich unterschiedlicher Inhibitoren

Die LMW Compounds SYD1890/4, SYD5115/2 und Org 274179-0 konnten dosisabhängig die Stimulation von M22 inhibieren. Da M22 die GD-IgG Stimulation simuliert, empfiehlt sich der Antikörper für anschließende Fragestellungen. Um das Potential der Compounds zu verifizieren, eignet sich ein erneuter Einsatz der Verdünnungsreihen in GOF-Kulturen, welche vordergründig durch TSH, aber auch durch Patientenserum oder KSAb1 stimuliert werden. Mit dem Compound S37a konnten die Potentiale der unterschiedlichen Stimulatoren in ähnlicher Potenz gehemmt werden, wobei das Experiment jedoch an HEK-293 Zellen durchgeführt wurde (Marcinkowski et al., 2019). Bestätigen die hier in GOF-Kulturen eingesetzten Compounds die Daten von Marcinkowski et al., so lässt sich eine größere Übertragbarkeit auf den Einsatz im humanen Organismus erhoffen.

Mit Org 274179-0, welcher neben der basalen Aktivität des TSH-Rezeptors auch die TSH- und TSI-vermittelte Rezeptoraktivierung in CHO-Zellen reduziert, konnten in den dargelegten Experimenten die Daten der vorherigen Arbeitsgruppen teilweise reproduziert werden. Dabei sind vor allem die GOF-Experimente von van Zeijl et al. von Interesse, welche ebenfalls mit der Inhibition mehrerer Stimulatoren gelang (van Zeijl et al., 2012). Nach erfolgreichem Einsatz im cAMP-Assay kann eine Wiederholung des Einsatzes der Verdünnungsreihen im HA-Assay die Ergebnisse nicht nur bestätigen, sondern eine noch zuverlässigere Abbildung der inhibitorischen Auswirkung auf den Signalweg bzw. den Rezeptorcrosstalk generieren.

Um alle genannten LMW-Compounds zuverlässig miteinander zu vergleichen, bedarf es eines einheitlichen Versuchsprotokolls. Nur wenn Zellart und -zahl, Kultivierungs- und Assayprotokoll übereinstimmen, sind die erhobenen Werte in pMol (cAMP-Assay) oder ng/ml (HA-Assay) vergleichbar. Die Variabilität der Rezeptordichte und Stimulierbarkeit in humanen Fibroblasten erschwert dabei zusätzlich den Vergleich mit internationalen Arbeiten. Der Vergleich von LMW-Compounds mit blockierenden Antikörpern ist ebenfalls herausfordernd. LMW-Compounds unterscheiden sich

grundlegend in der Struktur und interagieren meist an der transmembranen Region der Rezeptoren.

Die Quantität der erhobenen Daten über den blockierende Antikörper K1-70 reichen nicht aus, um eine zuverlässige Aussage über die Vergleichbarkeit des inhibitorischen Potentials gegenüber der eingesetzten LMW-Compounds zu erstellen. Die dosisabhängige Inhibition ist keineswegs ein Novum und wird an dieser Stelle somit nicht weiter diskutiert.

5.5. Inhibitoren im MTT-Assay

Die Ergebnisse des MTT-Assays dienen als Hinweis, dass weder die eingesetzten LMW-Compounds, noch der monoklonale Antikörper K1-70 in vitro zellschädigende Einflüsse ausweisen. Da verschiedene GOF-Kulturen den LMW-Compounds bzw. Antikörpern in hoher Konzentration und langer Inkubationszeit ausgesetzt wurden, stellen die Ergebnisse das Viabilitätsniveau nach einer verhältnismäßig starken Provokation dar. Die Daten unterstreichen die These, dass der potenzielle Viabilitätsverlust langer Inkubationszeiten im HA-Assay nicht den LMW-Compounds, sondern vielmehr dem fehlenden Kulturmedium zuzuschreiben ist. Es liegen jedoch keine Informationen über die Geschwindigkeit des Zerfalls der Substanzen vor. Daher lässt sich nicht ausschließen, dass die Viabilität zwischenzeitlich auf einem geringeren Niveau liegt und die Zellen über die Inkubationszeit hinweg Resistenzmechanismen entwickeln und mithilfe des F-Mediums regenerieren. Der Einfluss von M22 auf die Viabilität wurde nicht untersucht, sodass seine Bedeutung in dieser Hinsicht nicht beurteilt werden kann. Darüber hinaus bleibt das MTT-Assay eine Abbildung der in vitro Begebenheiten und kann somit kein vollständiges Bild über die komplexe Verstoffwechslung im tierischen oder humanen Organismus abbilden. Das Prinzip der Viabilitätsmessung eignet sich neben der Aktivitätsmessung nach der Immunglobulinstimulation, wie es bereits durch Hansen et al. erfolgte, auch zur ersten Abschätzung der Toxizität neuer inhibitorischer Substanzen (Hansen et al., 1993). Als Orientierung kann dabei die Arbeit von Marcinkowski et al. gelten, welche verschiedene Konzentrationen einsetzte und darüber hinaus auch die Bioverfügbarkeit ermittelte (Marcinkowski et al., 2019).

5.6. Ausblick

Durch die vorliegenden Ergebnisse werden weitreichende Fragen bzgl. potentieller Stärken und Schwächen des Kultivierungsprotokolls beantwortet. Daneben wird die Qualität der orbitalen Fibroblasten in verschiedenen Subkultivierungen, Passagen etc. in umfassendem Maße beantwortet. Eine Dokumentation über die patientenspezifische Medikation, welche im Vorfeld der Dekompressionsoperation erfolgte, könnte bei entsprechender Selektion geeigneter Gewebespende*rinnen (Ausschluss Immunsuppression) noch zuverlässigere Ergebnisse liefern.

Somit sollten sich anschließende Bemühungen v.a. mit der Frage der TSH-Rezeptorexpression der orbitalen Fibroblasten auseinandersetzen. Die TSH-Rezeptorexpression kann beispielsweise durch FACS-Analysen bestimmt werden (van Steensel et al., 2012). Eine Auswahl entsprechend hoher TSH-Rezeptorexpression der Fibroblasten könnte dem Pooling der Zellen zukünftig eine nachrangige Bedeutung zukommen lassen.

Daneben sollten die Ergebnisse einer Stimulation in 6-, 24- und 96-Well Platten verglichen werden. Im Falle einer gleichbleibenden Messqualität bzw. geringen Streuung können über die Stimulationen in 96-Well Platten hohe Mengen an Fibroblasten eingespart werden, was wiederum den Einsatz von frühen Passagen ermöglicht, die unter Umständen eine höhere TSH-Rezeptorexpression aufweisen.

Da im Hyaluronsäure-Assay üblicherweise deutlich stärkere Signale als im cAMP-Assay gemessen werden, dabei eine geringere Zellzahl erforderlich ist und die stimulierten Überstände bis zu ihrer Messung in Kryokonservation gelagert werden können, ergeben sich zahlreiche Vorteile. Hyaluronsäure wird erst nach Ablauf des Pathways synthetisiert, woraus sich ein weiterer Vorteil gegenüber dem cAMP ergibt, welches sich in G-Protein gekoppelten Rezeptoren ubiquitär findet und somit weniger spezifisch für die Rezeptoraktivierung steht. Eine Etablierung der Protokolle kann durch die Untersuchung großer Kollektive gelingen, welche sich in den FACS Analysen hochpositiv für den TSH-Rezeptor zeigen und nicht durch immunsuppressive Vorbehandlungen imponieren.

Primärzellen eignen sich gegenüber Zelllinien aufgrund weitreichender Vorteile für die Erprobung potenzieller Wirkstoffe, z.B. LMW Compounds und für die weitere Untersuchung des TSH/IGF-1 Rezeptorcrosstalks. Dabei könnte die Inkubation blockierender Antikörper oder neuartiger IGF-1-Rezeptor Inhibitoren wie Linsitinib die These über die Hemmung der TSH-abhängigen Hyaluronsäurestimulation untermauern (Chen et al. 2014). Werden die verbleibenden Fragen beantwortet, stehen Primärzellen zukünftig vermutlich im Mittelpunkt der Untersuchungen des TSH-/IGF1-Rezeptor Crosstalks und dessen Inhibition.

6. Zusammenfassung

6.1. Zusammenfassung (deutsch)

Die Ergebnisse dieser Dissertationsschrift geben uns ein besseres Verständnis über die pathophysiologischen Signalkaskaden, welche der Manifestation des Morbus Basedow am Auge zugrunde liegen. Durch die Ermittlung der *in vitro* Stimulations- und Inhibitionspotenziale an einem besonderen Kollektiv von Gewebespende*r*innen mit Endokriner Orbitopathie konnten klare Empfehlungen bzgl. Auswahl und Handhabung der Fibroblasten und geeigneter Rahmenbedingungen ausgesprochen werden.

Auf der Grundlage eines optimierten Kultivierungsprotokolls konnten orbitale Fibroblasten zahlreicher Gewebespende*r*innen kultiviert und auf ihre qualitative Beschaffenheit im MTT-Assay untersucht werden. Da der TSH-Rezeptor von orbitalen Fibroblasten auf der Oberfläche exprimiert wird, konnte dessen nachgeschaltete Signalkaskade im cAMP- und Hyaluronsäure Assay analysiert werden. Dabei gelang es unterschiedliche LMW Compounds in Verdünnungsreihen auf ihr blockierendes Potenzial zu untersuchen.

Die Stimulation von cAMP gelang in mehreren GOF-Kulturen besonders gut mittels Forskolin und Patienten-Serum. Verdünnte Seren führten, entsprechend der Erwartungen, zu niedrigeren cAMP-Ausschlägen. Immunglobuline der Klasse G, welche aus den äquivalenten Seren isoliert wurden, erzielten in den Assays weitaus niedrigere cAMP-Ausschläge als Ursprungsseren. Da sich in der Untersuchung von Messzeitpunkt und -methode des cAMP-Assay keine Verbesserungen durch abweichende Protokolle feststellen ließen, sollte den Literaturhinweisen nicht weiter nachgegangen und auf das Herstellerprotokoll vertraut werden. In der Kultur von orbitalen Fibroblasten gelang im cAMP- sowie Hyaluronsäure-Assay einseitig die dosisabhängige Stimulation mit M22, andererseits auch die dosisabhängige Inhibition mittels LMW-Compounds. Dabei mussten in beiden Assays aufwändig ermittelte Stimulationsbedingungen vorliegen (siehe oben). Es bedarf einen Pool an mehreren GOF-Kulturen, da nicht immer mit einer dosisabhängigen Inhibitionsfähigkeit gerechnet werden kann. Die LMW Compounds erweisen sich hinsichtlich Zellviabilität im MTT-Assay als unbedenklich. Im cAMP-Assay zeigten sich bei 10.000 Zellen/96-Well, einer Stimulationszeit von 30-60 Minuten und einer Vorinkubation mit IBMX als geeignete Parameter für Stimulationsversuche. Dabei eignet sich eine M22-Konzentration von

1,6 ng/ml (EC 80, ermittelt im Bioassay) am besten für nachfolgende Inhibitionsversuche. Dem gegenüber empfiehlt sich im Hyaluronsäure-Assay eine Zellzahl von 7000/96-Well, bei einer Stimulationszeit von sechs Stunden und einer M22-Konzentration von 10 ng/ml. Alle Stimulationsversuche konnten erfolgreich in 96-Well-Platten durchgeführt werden.

6.2. Summary

The results of this dissertation give us a better understanding of the pathophysiological signaling cascades underlying the manifestation of Graves' disease in the eye. By determining the in vitro stimulation and inhibition potentials in a special collective of tissue donors with endocrine orbitopathy, we were able to propose clear recommendations regarding the selection and handling of fibroblasts as well as suitable framework conditions.

Based on an optimized cultivation protocol, orbital fibroblasts from numerous tissue donors could be cultured and examined for their qualitative properties in the MTT assay. Since the TSH receptor is expressed on the surface of orbital fibroblasts, its downstream signaling cascade could be analyzed in the cAMP and hyaluronic acid assay. It was thereby possible to test different LMW compounds in dilution series for their blocking potential.

Stimulation of cAMP was particularly successful in several GOF cultures using forskolin and patient serum. As expected, diluted sera resulted in lower cAMP levels. Class G immunoglobulins which were isolated from the equivalent sera yielded much lower cAMP readings in the assays than the original sera. Since no improvements could be seen by using deviating time and measurement protocols of the cAMP assay, the literature references should not be pursued further and the manufacturer's protocols should be relied on. In the culture of orbital fibroblasts, the cAMP and hyaluronic acid assays succeeded in dose-dependent stimulation with M22 on the one hand and dose-dependent inhibition with LMW compounds on the other. This required elaborately determined stimulation conditions for both assays (see above). A pool of several GOF cultures is required, since dose-dependent inhibition ability cannot always be counted on. The LMW compounds proved to be unproblematic concerning cell viability in the MTT assay. In the cAMP assay, 10,000 cells/96-well, a stimulation time

of 30-60 minutes and a pre-incubation with IBMX showed to be suitable parameters for stimulation experiments. Thus, an M22 concentration of 1.6 ng/ml (EC 80, determined by bioassay) is best suitable for subsequent inhibition experiments. For the hyaluronic acid assay, however, a cell number of 7,000/96-well, a stimulation time of six hours and an M22 concentration of 10 ng/ml is recommended. All stimulation experiments could be successfully performed in 96-well plates.

7. Literaturverzeichnis

Abraham, P. *et al.* (2004) 'Antithyroid drug regimen for treating Graves' hyperthyroidism', *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2), p. CD003420. Available at: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003420.pub2>.

Adams, D.D. *et al.* (1974) 'Stimulation of the human thyroid by infusions of plasma containing LATS protector', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 39(5), pp. 826–832. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem-39-5-826>.

Alberts, B. *et al.* (2002) 'Fibroblasts and Their Transformations: The Connective-Tissue Cell Family', *Molecular Biology of the Cell. 4th edition* [Preprint]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26889/> (Accessed: 28 July 2022).

Alsuhaibani, A.H. *et al.* (2011) 'Orbital volume and eye position changes after balanced orbital decompression', *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, 27(3), pp. 158–163. Available at: <https://doi.org/10.1097/IOP.0b013e3181ef72b3>.

Antonelli, A. *et al.* (2015) 'Autoimmune thyroid disorders', *Autoimmunity Reviews*, 14(2), pp. 174–180. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.10.016>.

Antonelli, A. *et al.* (2020) 'Graves' disease: Epidemiology, genetic and environmental risk factors and viruses', *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 34(1), p. 101387. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2020.101387>.

Bahn, R.S. (2010) 'Graves' ophthalmopathy', *The New England Journal of Medicine*, 362(8), pp. 726–738. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMra0905750>.

Bartalena, L. *et al.* (1983) 'Orbital cobalt irradiation combined with systemic corticosteroids for Graves' ophthalmopathy: comparison with systemic corticosteroids alone', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 56(6), pp. 1139–1144. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem-56-6-1139>.

Bartalena, L. *et al.* (2008) 'Consensus statement of the European Group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) on management of GO', *European Journal of Endocrinology*, 158(3), pp. 273–285. Available at: <https://doi.org/10.1530/EJE-07-0666>.

Bartalena, L. (2013) 'Diagnosis and management of Graves disease: a global overview', *Nature Reviews. Endocrinology*, 9(12), pp. 724–734. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.193>.

Bartley, G.B. *et al.* (1996) 'Chronology of Graves' ophthalmopathy in an incidence cohort', *American Journal of Ophthalmology*, 121(4), pp. 426–434. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(14\)70439-8](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(14)70439-8).

Beck, B. *et al.* (1992) 'Glykosaminoglykansynthese retrobulbärer Fibroblasten und humorale Immunität bei endokriner Orbitopathie', *undefined* [Preprint]. Available at: </paper/Glykosaminoglykansynthese-retrobulb%C3%A4rer-und-bei-Beck-Heintz/f1ea805e533cc021c5d614d7daed6ab083312507> (Accessed: 8 April 2021).

Beever, K. *et al.* (1989) 'Highly sensitive assays of autoantibodies to thyroglobulin and to thyroid peroxidase', *Clinical Chemistry*, 35(9), pp. 1949–1954.

Benker, G., Kahaly, G.J. and Reinwein, D. (1999) 'What can the European Multicenter Trial on the treatment of Graves' disease with antithyroid drugs teach us about the course of thyroid-associated orbitopathy (TAO)? European Multicenter Trial Group', *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 107 Suppl 5, pp. S186-189. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0029-1212182>.

Norpoth, Leo. (1953) 'Basedow, Karl Adolph von' - *Deutsche Biographie*. Bayerische Staatsbibliothek. Available at: <https://www.deutsche-biographie.de/sfz2186.html#ndbcontent> (Accessed: 9 March 2021).

Boboridis, K.G. and Bunce, C. (2011) 'Surgical orbital decompression for thyroid eye disease', *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (12), p. CD007630. Available at: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007630.pub2>.

Boutin, A. *et al.* (2014) ' β -Arrestin-1 mediates thyrotropin-enhanced osteoblast differentiation', *The FASEB Journal*, 28(8), pp. 3446–3455. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.14-251124>.

Brix, T.H. *et al.* (2001) 'Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(2), pp. 930–934. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.86.2.7242>.

Brix, T.H. and Hegedüs, L. (2012) 'Twin studies as a model for exploring the aetiology of autoimmune thyroid disease', *Clinical Endocrinology*, 76(4), pp. 457–464. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04318.x>.

Burch, H.B. *et al.* (1994) 'Thyrotropin receptor antisera for the detection of immunoreactive protein species in retroocular fibroblasts obtained from patients with Graves' ophthalmopathy', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 78(6), pp. 1384–1391. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.78.6.8200941>.

Cao, H.J. *et al.* (1995) 'Transforming growth factor-beta induces plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured human orbital fibroblasts', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 36(7), pp. 1411–1419.

Cascone, P. *et al.* (2012) 'Compression and stretching in Graves orbitopathy: emergency orbital decompression techniques', *The Journal of Craniofacial Surgery*, 23(5), pp. 1430–1433. Available at: <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e31825e3acf>.

Catargi, B. *et al.* (1999) 'Optimized radioiodine therapy of Graves' disease: analysis of the delivered dose and of other possible factors affecting outcome', *European Journal of Endocrinology*, 141(2), pp. 117–121. Available at: <https://doi.org/10.1530/eje.0.1410117>.

Chang, M., Baek, S. and Lee, T.S. (2013) 'Long-term outcomes of unilateral orbital fat decompression for thyroid eye disease', *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, 251(3), pp. 935–939. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00417-012-2195-1>.

Chen, H. *et al.* (2014) 'Teprotumumab, an IGF-1R Blocking Monoclonal Antibody Inhibits TSH and IGF-1 Action in Fibrocytes', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(9), pp. E1635–E1640. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1580>.

Cirello, V. *et al.* (2015) 'Fetal cell microchimerism: a protective role in autoimmune thyroid diseases', *European Journal of Endocrinology*, 173(1), pp. 111–118. Available at: <https://doi.org/10.1530/EJE-15-0028>.

Clauser, L.C. *et al.* (2012) 'Surgical decompression in endocrine orbitopathy. Visual evoked potential evaluation and effect on the optic nerve', *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery: Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 40(7), pp. 621–625. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2012.01.027>.

Coles, A.J. *et al.* (1999) 'Pulsed monoclonal antibody treatment and autoimmune thyroid disease in multiple sclerosis', *Lancet (London, England)*, 354(9191), pp. 1691–1695. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)02429-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)02429-0).

Cooper, D.S. (2005) 'Antithyroid drugs', *The New England Journal of Medicine*, 352(9), pp. 905–917. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMra042972>.

Costagliola, S. *et al.* (2004) 'Delineation of the discontinuous-conformational epitope of a monoclonal antibody displaying full in vitro and in vivo thyrotropin activity', *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 18(12), pp. 3020–3034. Available at: <https://doi.org/10.1210/me.2004-0231>.

Crisp, M.S. *et al.* (1997) 'Thyrotropin receptor transcripts in human adipose tissue', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(6), pp. 2003–2005.

Criswell, L.A. *et al.* (2005) 'Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes', *American Journal of Human Genetics*, 76(4), pp. 561–571. Available at: <https://doi.org/10.1086/429096>.

Davies, T.F. (2008) 'Infection and autoimmune thyroid disease', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(3), pp. 674–676. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0095>.

Deller, T. (2018) *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: das Lehrbuch*. 5. Auflage. Edited by U. Welsch, W. Kummer, and S. Elsberger. München: Elsevier.

Diana, T. *et al.* (2014) 'Clinical relevance of thyroid-stimulating autoantibodies in pediatric graves' disease-a multicenter study', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(5), pp. 1648–1655. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2013-4026>.

Diana, T. *et al.* (2015) 'Standardization of a bioassay for thyrotropin receptor stimulating autoantibodies', *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 25(2), pp. 169–175. Available at: <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0346>.

Diana, T. *et al.* (2016) 'Analytical Performance and Validation of a Bioassay for Thyroid-Blocking Antibodies', *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 26(5), pp. 734–740. Available at: <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0447>.

Diana, T. *et al.* (2020) 'Comparison of a Novel Homogeneous Cyclic Amp Assay and a Luciferase Assay for Measuring Stimulating Thyrotropin-Receptor Autoantibodies', *European Thyroid Journal*, 9(2), pp. 67–72. Available at: <https://doi.org/10.1159/000504509>.

Diana, T., Olivo, P.D. and Kahaly, G.J. (2018) 'Thyrotropin Receptor Blocking Antibodies', *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, 50(12), pp. 853–862. Available at: <https://doi.org/10.1055/a-0723-9023>.

Dittmar M, Libich C, Brenzel T, Kahaly GJ. Increased familial clustering of autoimmune thyroid diseases. *Horm Metab Res*. 2011 Mar;43(3):200-4. doi: 10.1055/s-0031-1271619. Epub 2011 Feb 1. PMID: 21287436.

Drexler, H.G. and Uphoff, C.C. (2002) 'Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention', *Cytotechnology*, 39(2), pp. 75–90. Available at: <https://doi.org/10.1023/A:1022913015916>.

Eckstein, A.K. *et al.* (2006) 'Thyrotropin receptor autoantibodies are independent risk factors for Graves' ophthalmopathy and help to predict severity and outcome of the disease', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(9), pp. 3464–3470. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2813>.

Evans, M. *et al.* (2010) 'Monoclonal autoantibodies to the TSH receptor, one with stimulating activity and one with blocking activity, obtained from the same blood sample', *Clinical Endocrinology*, 73(3), pp. 404–412. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2010.03831.x>.

Feliciello, A. *et al.* (1993) 'Expression of thyrotropin-receptor mRNA in healthy and Graves' disease retro-orbital tissue', *Lancet (London, England)*, 342(8867), pp. 337–338. Available at: [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)91475-2](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)91475-2).

Franklyn, J.A. *et al.* (1999) 'Cancer incidence and mortality after radioiodine treatment for hyperthyroidism: a population-based cohort study', *Lancet (London, England)*, 353(9170), pp. 2111–2115. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)12295-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)12295-X).

Frenzel, R., Voigt, C. and Paschke, R. (2006) 'The human thyrotropin receptor is predominantly internalized by beta-arrestin 2', *Endocrinology*, 147(6), pp. 3114–3122. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2005-0687>.

Furszyfer, J. *et al.* (1972) 'Epidemiologic aspects of Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease in rochester, minnesota (1935–1967), with special reference to temporal trends', *Metabolism*, 21(3), pp. 197–204. Available at: [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(72\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0026-0495(72)90041-8).

Gärtner, R. *et al.* (2002) 'Selenium supplementation in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid peroxidase antibodies concentrations', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(4), pp. 1687–1691. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.87.4.8421>.

Gärtner, R. and Gasnier, B.C.H. (2003) 'Selenium in the treatment of autoimmune thyroiditis', *BioFactors (Oxford, England)*, 19(3–4), pp. 165–170. Available at: <https://doi.org/10.1002/biof.5520190309>.

Gerling, J. *et al.* (2003) 'Retrobulbar irradiation for thyroid-associated orbitopathy: double-blind comparison between 2.4 and 16 Gy', *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 55(1), pp. 182–189. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(02\)03795-1](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(02)03795-1).

Goldberg, R.A. *et al.* (2000) 'Strabismus after balanced medial plus lateral wall versus lateral wall only orbital decompression for dysthyroid orbitopathy', *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, 16(4), pp. 271–277. Available at: <https://doi.org/10.1097/00002341-200007000-00004>.

Gorman, C.A. *et al.* (2020) 'A Prospective, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study of Orbital Radiotherapy for Graves' Ophthalmopathy', *Ophthalmology*, 127(4S), pp. S160–S171. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2020.01.031>.

Guo, N. *et al.* (2010) 'Mast Cell-derived Prostaglandin D2 Controls Hyaluronan Synthesis in Human Orbital Fibroblasts via DP1 Activation', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(21), pp. 15794–15804. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.074534>.

Gupta, A., Sadeghi, P.B. and Akpek, E.K. (2009) 'Occult thyroid eye disease in patients presenting with dry eye symptoms', *American Journal of Ophthalmology*, 147(5), pp. 919–923. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2008.12.007>.

Hansen, C. *et al.* (1993) 'Retrolbulbar adipocytes and humoral immunity in Graves' ophthalmopathy', *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, 25(12), pp. 618–622. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-2007-1002191>.

Hayflick, L. (1965) 'The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains', *Experimental Cell Research*, 37(3), pp. 614–636. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9).

Heufelder, A.E. *et al.* (1995) 'Analysis of retroorbital T cell antigen receptor variable region gene usage in patients with Graves' ophthalmopathy', *European Journal of Endocrinology*, 132(3), pp. 266–277. Available at: <https://doi.org/10.1530/eje.0.1320266>.

Heufelder, A.E., Wenzel, B.E. and Scriba, P.C. (1996) 'Antigen receptor variable region repertoires expressed by T cells infiltrating thyroid, retroorbital, and pretibial tissue in Graves' disease', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(10), pp. 3733–3739. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.81.10.8855831>.

Hidaka, Y. *et al.* (1993) 'Recurrence of thyrotoxicosis after attack of allergic rhinitis in patients with Graves' disease', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 77(6), pp. 1667–1670. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.77.6.8263157>.

Hiromatsu, Y. *et al.* (1996) 'Localization and clinical significance of thyrotropin receptor mRNA expression in orbital fat and eye muscle tissues from patients with thyroid-associated ophthalmopathy', *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 6(6), pp. 553–562. Available at: <https://doi.org/10.1089/thy.1996.6.553>.

Hoa, N. *et al.* (2012) 'Nuclear Targeting of IGF-1 Receptor in Orbital Fibroblasts from Graves' Disease: Apparent Role of ADAM17', *PLOS ONE*, 7(4), p. e34173. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034173>.

Holm, I.A. *et al.* (2005) 'Smoking and other lifestyle factors and the risk of Graves' hyperthyroidism', *Archives of Internal Medicine*, 165(14), pp. 1606–1611. Available at: <https://doi.org/10.1001/archinte.165.14.1606>.

'Human ocular anatomy' (2015) *Clinics in Dermatology*, 33(2), pp. 140–146. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.10.006>.

Iyer, S. and Bahn, R. (2012) 'Immunopathogenesis of Graves' ophthalmopathy: the role of the TSH receptor', *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 26(3), pp. 281–289. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2011.10.003>.

Kaback, L.A. and Smith, T.J. (1999) 'Expression of hyaluronan synthase messenger ribonucleic acids and their induction by interleukin-1beta in human orbital fibroblasts: potential insight into the molecular pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(11), pp. 4079–4084. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.84.11.6111>.

Kahaly, G. *et al.* (1986) 'Ciclosporin and prednisone v. prednisone in treatment of Graves' ophthalmopathy: a controlled, randomized and prospective study', *European Journal of Clinical Investigation*, 16(5), pp. 415–422. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1986.tb01016.x>.

Kahaly, G. *et al.* (1992) 'In vitro synthesis of glycosaminoglycans in endocrine ophthalmopathy', *Acta Endocrinologica*, 127(5), pp. 397–402. Available at: <https://doi.org/10.1530/acta.0.1270397>.

Kahaly, G. *et al.* (1993) 'Glycosaminoglycan antibodies in endocrine ophthalmopathy', *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, 25(12), pp. 637–639. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-2007-1002195>.

Kahaly, G., Pitz, S., *et al.* (1996) 'Randomized trial of intravenous immunoglobulins versus prednisolone in Graves' ophthalmopathy', *Clinical and Experimental Immunology*, 106(2), pp. 197–202. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1996.d01-854.x>.

Kahaly, G., Otto, E., *et al.* (1996) 'T cells and orbital connective tissue in endocrine orbitopathy', *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 104 Suppl 4, pp. 79–83. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0029-1211708>.

Kahaly, G. *et al.* (1997) '[Recent interdisciplinary diagnosis and therapy of endocrine orbitopathy]', *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)*, 122(1–2), pp. 27–32. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-2008-1047573>.

Kahaly, G.J. *et al.* (2000) 'Low- versus high-dose radiotherapy for Graves' ophthalmopathy: a randomized, single blind trial', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(1), pp. 102–108. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.85.1.6257>.

Kahaly, G.J. *et al.* (2005) 'Randomized, single blind trial of intravenous versus oral steroid monotherapy in Graves' orbitopathy', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(9), pp. 5234–5240. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0148>.

Kahaly, G.J. *et al.* (2007) '[Decompression surgery for endocrine orbitopathy]', *Medizinische Klinik (Munich, Germany: 1983)*, 102(9), pp. 714–719. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00063-007-1097-1>.

Kahaly, G.J. *et al.* (2018) '2018 European Thyroid Association Guideline for the Management of Graves' Hyperthyroidism', *European Thyroid Journal*, 7(4), pp. 167–186. Available at: <https://doi.org/10.1159/000490384>.

Kalman, R. and Mourits, M.P. (2002) 'Late recurrence of unilateral graves orbitopathy on the contralateral side', *American Journal of Ophthalmology*, 133(5), pp. 727–729. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(02\)01390-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(02)01390-9).

Kazim, M., Goldberg, R.A. and Smith, T.J. (2002) 'Insights into the pathogenesis of thyroid-associated orbitopathy: evolving rationale for therapy', *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*, 120(3), pp. 380–386. Available at: <https://doi.org/10.1001/archophth.120.3.380>.

Kels, B.D., Grzybowski, A. and Grant-Kels, J.M. (2015) 'Human ocular anatomy', *Clinics in Dermatology*, 33(2), pp. 140–146. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.10.006>.

Kendler, D.L., Lippa, J. and Rootman, J. (1993) 'The initial clinical characteristics of Graves' orbitopathy vary with age and sex', *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*, 111(2), pp. 197–201. Available at: <https://doi.org/10.1001/archophth.1993.01090020051022>.

Kisiel, B. *et al.* (2008) 'Polymorphism of the oestrogen receptor beta gene (ESR2) is associated with susceptibility to Graves' disease', *Clinical Endocrinology*, 68(3), pp. 429–434. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.03060.x>.

Kleinau, G. *et al.* (2010) 'Signaling-sensitive amino acids surround the allosteric ligand binding site of the thyrotropin receptor', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(7), pp. 2347–2354. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.09-149146>.

Kopp, P. (1997) 'Key elements involved in the negative regulation of the TSH receptor: G protein-coupled receptor kinases, arrestin and inducible cAMP early repressor', *European Journal of Endocrinology*, 136(3), pp. 269–270. Available at: <https://doi.org/10.1530/eje.0.1360269>.

van Koppen, C.J. *et al.* (2012) 'Mechanism of action of a nanomolar potent, allosteric antagonist of the thyroid-stimulating hormone receptor', *British Journal of*

Pharmacology, 165(7), pp. 2314–2324. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01709.x>.

Krieger, C.C. *et al.* (2015) 'Bidirectional TSH and IGF-1 receptor cross talk mediates stimulation of hyaluronan secretion by Graves' disease immunoglobins', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(3), pp. 1071–1077. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2014-3566>.

Krieger, C.C. *et al.* (2016) 'TSH/IGF-1 Receptor Cross Talk in Graves' Ophthalmopathy Pathogenesis', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(6), pp. 2340–2347. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1315>.

Krieger, C.C. *et al.* (2019) 'Arrestin- β -1 Physically Scaffolds TSH and IGF1 Receptors to Enable Crosstalk', *Endocrinology*, 160(6), pp. 1468–1479. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2019-00055>.

Krieger, C.C. and Gershengorn, M.C. (2014) 'A modified ELISA accurately measures secretion of high molecular weight hyaluronan (HA) by Graves' disease orbital cells', *Endocrinology*, 155(2), pp. 627–634. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2013-1890>.

Krieger, C.C., Neumann, S. and Gershengorn, M.C. (2020) 'TSH/IGF1 Receptor Crosstalk: Mechanism and Clinical Implications', *Pharmacology & therapeutics*, 209, p. 107502. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107502>.

Laurberg, P. *et al.* (1991) 'High incidence of multinodular toxic goitre in the elderly population in a low iodine intake area vs. high incidence of Graves' disease in the young in a high iodine intake area: comparative surveys of thyrotoxicosis epidemiology in East-Jutland Denmark and Iceland', *Journal of Internal Medicine*, 229(5), pp. 415–420. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.1991.tb00368.x>.

Le Moli, R. *et al.* (2007) 'Determinants of liver damage associated with intravenous methylprednisolone pulse therapy in Graves' ophthalmopathy', *Thyroid: Official*

Journal of the American Thyroid Association, 17(4), pp. 357–362. Available at: <https://doi.org/10.1089/thy.2006.0267>.

Leong, S.C. *et al.* (2009) 'A systematic review of outcomes following surgical decompression for dysthyroid orbitopathy', *The Laryngoscope*, 119(6), pp. 1106–1115. Available at: <https://doi.org/10.1002/lary.20213>.

Li, Y. *et al.* (2013) 'A novel bioassay for anti-thyrotrophin receptor autoantibodies detects both thyroid-blocking and stimulating activity', *Clinical and Experimental Immunology*, 173(3), pp. 390–397. Available at: <https://doi.org/10.1111/cei.12129>.

Liebschner *et al.* (1992) 'Antikörper gegen Glykosaminoglykane bei endokriner Orbitopathie | Semantic Scholar'. Available at: [/paper/Antik%C3%B6rper-gegen-Glykosaminoglykane-bei-endokriner-Liebschner-Schuler/93dc9c8c83034ae615477e6e5560d87aef75ba3c](https://www.semanticscholar.org/paper/Antik%C3%B6rper-gegen-Glykosaminoglykane-bei-endokriner-Liebschner-Schuler/93dc9c8c83034ae615477e6e5560d87aef75ba3c) (Accessed: 8 April 2021).

MacFarland, S.P. *et al.* (2018) 'Disease Burden and Outcome in Children and Young Adults With Concurrent Graves Disease and Differentiated Thyroid Carcinoma', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 103(8), pp. 2918–2925. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00026>.

Major, B.J., Cures, A. and Frauman, A.G. (1997) 'The full length and splice variant thyrotropin receptor is expressed exclusively in skeletal muscle of extraocular origin: a link to the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 230(3), pp. 493–496. Available at: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.5982>.

Man, T.P. (no date) *Why is Trypsin the Preferred Choice for Peptide Generation?* Available at: <https://info.gbiosciences.com/blog/why-is-trypsin-the-preferred-choice-for-peptide-generation> (Accessed: 18 July 2022).

Marcinkowski, P. *et al.* (2019) 'A New Highly Thyrotropin Receptor-Selective Small-Molecule Antagonist with Potential for the Treatment of Graves' Orbitopathy',

Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association, 29(1), pp. 111–123. Available at: <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0349>.

Marcocci, C. *et al.* (2001) 'Comparison of the effectiveness and tolerability of intravenous or oral glucocorticoids associated with orbital radiotherapy in the management of severe Graves' ophthalmopathy: results of a prospective, single-blind, randomized study', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(8), pp. 3562–3567. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.86.8.7737>.

Marcocci, C. *et al.* (2003) 'Long-term safety of orbital radiotherapy for Graves' ophthalmopathy', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(8), pp. 3561–3566. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030260>.

Marcocci, C. *et al.* (2011) 'Selenium and the course of mild Graves' orbitopathy', *The New England Journal of Medicine*, 364(20), pp. 1920–1931. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1012985>.

Marcus-Samuels, B. *et al.* (2018) 'Evidence That Graves' Ophthalmopathy Immunoglobulins Do Not Directly Activate IGF-1 Receptors', *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 28(5), pp. 650–655. Available at: <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0089>.

Marinó, M. *et al.* (2004) 'Acute and severe liver damage associated with intravenous glucocorticoid pulse therapy in patients with Graves' ophthalmopathy', *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 14(5), pp. 403–406. Available at: <https://doi.org/10.1089/105072504774193276>.

Marquez, S.D. *et al.* (2001) 'Long-term results of irradiation for patients with progressive Graves' ophthalmopathy', *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 51(3), pp. 766–774. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(01\)01699-6](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(01)01699-6).

McGrogan, A. *et al.* (2008) 'The incidence of autoimmune thyroid disease: a systematic review of the literature', *Clinical Endocrinology*, 69(5), pp. 687–696. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03338.x>.

McKenna, T.J. (2001) 'Graves' disease', *The Lancet*, 357(9270), pp. 1793–1796. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04906-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04906-0).

Mourits, M.P. *et al.* (1997) 'Clinical activity score as a guide in the management of patients with Graves' ophthalmopathy', *Clinical Endocrinology*, 47(1), pp. 9–14. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.1997.2331047.x>.

Mourits, M.P. *et al.* (2000) 'Radiotherapy for Graves' orbitopathy: randomised placebo-controlled study', *Lancet (London, England)*, 355(9214), pp. 1505–1509. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02165-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02165-6).

Nakashima, M., Martin, A. and Davies, T.F. (1996) 'Intrathyroidal T cell accumulation in Graves' disease: delineation of mechanisms based on in situ T cell receptor analysis', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(9), pp. 3346–3351. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.81.9.8784095>.

Neumann, S. *et al.* (2012) 'A Drug-Like Antagonist Inhibits Thyrotropin Receptor–Mediated Stimulation of cAMP Production in Graves' Orbital Fibroblasts', *Thyroid*, 22(8), pp. 839–843. Available at: <https://doi.org/10.1089/thy.2011.0520>.

Olivari, N. (2010) '[Endocrine ophthalmopathy: surgical treatment]', *HNO*, 58(1), pp. 8–10, 12–14. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00106-009-2025-x>.

Onaran, Z. *et al.* (2014) 'Intraocular pressure lowering effect of orbital decompression is related to increased venous outflow in Graves orbitopathy', *Current Eye Research*, 39(7), pp. 666–672. Available at: <https://doi.org/10.3109/02713683.2013.867355>.

Pandamooz, S. *et al.* (2012) 'Short exposure to collagenase and coculture with mouse embryonic pancreas improve human dermal fibroblast culture', *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 59(3), pp. 254–261. Available at: <https://doi.org/10.1002/bab.1020>.

Paschke, R., Vassart, G. and Ludgate, M. (1995) 'Current evidence for and against the TSH receptor being the common antigen in Graves' disease and thyroid associated ophthalmopathy', *Clinical Endocrinology*, 42(6), pp. 565–569. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1995.tb02681.x>.

Perros, P. *et al.* (1993) 'Age and gender influence the severity of thyroid-associated ophthalmopathy: a study of 101 patients attending a combined thyroid-eye clinic', *Clinical Endocrinology*, 38(4), pp. 367–372. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1993.tb00516.x>.

Perros, P., Crombie, A.L. and Kendall-Taylor, P. (1995) 'Natural history of thyroid associated ophthalmopathy', *Clinical Endocrinology*, 42(1), pp. 45–50. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1995.tb02597.x>.

Perros, P. and Krassas, G.E. (2002) 'Orbital irradiation for thyroid-associated orbitopathy: conventional dose, low dose or no dose?', *Clinical Endocrinology*, 56(6), pp. 689–691. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.2002.01525.x>.

Place, R.F. *et al.* (2017) 'Inhibiting thyrotropin/insulin-like growth factor 1 receptor crosstalk to treat Graves' ophthalmopathy: studies in orbital fibroblasts in vitro', *British Journal of Pharmacology*, 174(4), pp. 328–340. Available at: <https://doi.org/10.1111/bph.13693>.

Ponto, K. A. *et al.* (2009a) '[Management of Graves' orbitopathy: evidence-based recommendations]', *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)*, 134(49), pp. 2521–2524. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0029-1243057>.

Ponto, Katharina A. *et al.* (2009) 'Quality of Life and Occupational Disability in Endocrine Orbitopathy', *Deutsches Aerzteblatt Online* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0283>.

Pritchard, J. *et al.* (2003) 'Immunoglobulin activation of T cell chemoattractant expression in fibroblasts from patients with Graves' disease is mediated through the insulin-like growth factor I receptor pathway', *Journal of Immunology (Baltimore)*,

Md.: 1950), 170(12), pp. 6348–6354. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.12.6348>.

Prummel, M.F. *et al.* (1990) 'Effect of abnormal thyroid function on the severity of Graves' ophthalmopathy', *Archives of Internal Medicine*, 150(5), pp. 1098–1101.

Prummel, M.F. *et al.* (1993) 'Randomized double-blind trial of prednisone versus radiotherapy in Graves' ophthalmopathy', *Lancet (London, England)*, 342(8877), pp. 949–954. Available at: [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)92001-a](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)92001-a).

Prummel, M.F. *et al.* (2004) 'A randomized controlled trial of orbital radiotherapy versus sham irradiation in patients with mild Graves' ophthalmopathy', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(1), pp. 15–20. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030809>.

Rajendram, R. *et al.* (2012) 'Orbital radiotherapy for adult thyroid eye disease', *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (7), p. CD007114. Available at: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007114.pub2>.

Razin, S., Yogev, D. and Naot, Y. (1998) 'Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), pp. 1094–1156.

Reddy, L. *et al.* (1998) 'Assessment of rapid morphological changes associated with elevated cAMP levels in human orbital fibroblasts', *Experimental Cell Research*, 245(2), pp. 360–367. Available at: <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4273>.

Reinwein, D. *et al.* (1993) 'A prospective randomized trial of antithyroid drug dose in Graves' disease therapy. European Multicenter Study Group on Antithyroid Drug Treatment', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 76(6), pp. 1516–1521. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.76.6.8501160>.

Rocchi, R. *et al.* (2012) 'Rehabilitative orbital decompression for Graves' orbitopathy: risk factors influencing the new onset of diplopia in primary gaze, outcome, and patients' satisfaction', *Thyroid: Official Journal of the American*

Thyroid Association, 22(11), pp. 1170–1175. Available at: <https://doi.org/10.1089/thy.2012.0272>.

Ron, E. *et al.* (1998) 'Cancer mortality following treatment for adult hyperthyroidism. Cooperative Thyrotoxicosis Therapy Follow-up Study Group', *JAMA*, 280(4), pp. 347–355. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.280.4.347>.

Roncevic, R., Savkovic, Z. and Roncevic, D. (2014) 'Results of diplopia and strabismus in patients with severe thyroid ophthalmopathy after orbital decompression', *Indian Journal of Ophthalmology*, 62(3), pp. 268–273. Available at: <https://doi.org/10.4103/0301-4738.120206>.

Rootman, J. (2003) *Diseases of the orbit*. 2nd ed. Philadelphia [u.a]: Lippincott Williams & Wilkins.

Saber, E. *et al.* (1996) 'Extraocular muscle changes in experimental orbital venous stasis: some similarities to Graves' orbitopathy', *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, 234(5), pp. 331–336. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00220709>.

Salvi, M. *et al.* (2004) 'Onset of autoimmune hepatitis during intravenous steroid therapy for thyroid-associated ophthalmopathy in a patient with Hashimoto's thyroiditis: case report', *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 14(8), pp. 631–634. Available at: <https://doi.org/10.1089/1050725041692927>.

Sato, A. *et al.* (1999) 'A possible role of immunoglobulin E in patients with hyperthyroid Graves' disease', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(10), pp. 3602–3605. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.84.10.6038>.

Scholz, G.H. *et al.* (2003) 'Is there a place for thyroidectomy in older patients with thyrotoxic storm and cardiorespiratory failure?', *Thyroid: Official Journal of the*

American Thyroid Association, 13(10), pp. 933–940. Available at: <https://doi.org/10.1089/105072503322511337>.

Shapira, Y., Agmon-Levin, N. and Shoenfeld, Y. (2010) 'Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity', *Journal of Autoimmunity*, 34(3), pp. J168–J177. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.11.018>.

Shepard, K.G., Levin, P.S. and Terris, D.J. (1998) 'Balanced orbital decompression for Graves' ophthalmopathy', *The Laryngoscope*, 108(11 Pt 1), pp. 1648–1653. Available at: <https://doi.org/10.1097/00005537-199811000-00011>.

Siracuse-Lee, D.E. and Kazim, M. (2002) 'Orbital decompression: current concepts', *Current Opinion in Ophthalmology*, 13(5), pp. 310–316. Available at: <https://doi.org/10.1097/00055735-200210000-00004>.

Smith, B.R. *et al.* (2004) 'A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies', *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 14(10), pp. 830–835. Available at: <https://doi.org/10.1089/thy.2004.14.830>.

Smith, T.J. *et al.* (1992) 'Interferon-gamma is an inducer of plasminogen activator inhibitor type 1 in human orbital fibroblasts', *The American Journal of Physiology*, 263(1 Pt 1), pp. C24-29. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1992.263.1.C24>.

Smith, T.J., Bahn, R.S. and Gorman, C.A. (1989) 'Connective Tissue, Glycosaminoglycans, and Diseases the Thyroid*', *Endocrine Reviews*, 10(3), pp. 366–391. Available at: <https://doi.org/10.1210/edrv-10-3-366>.

Smith, T.J. and Hegedüs, L. (2016) *Graves' Disease*, <https://doi.org/10.1056/NEJMra1510030>. Massachusetts Medical Society. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1510030>.

Smith, T.J. and Hoa, N. (2004) 'Immunoglobulins from patients with Graves' disease induce hyaluronan synthesis in their orbital fibroblasts through the self-antigen, insulin-like growth factor-I receptor', *The Journal of Clinical Endocrinology and*

Metabolism, 89(10), pp. 5076–5080. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0716>.

Solomon, D.H., Beck, J.C. and Vanderlaan, W.P. (1953) 'Prognosis of hyperthyroidism treated by antithyroid drugs', *Journal of the American Medical Association*, 152(3), pp. 201–205. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.1953.03690030001001>.

Sorisky, A. *et al.* (1996) 'Evidence of adipocyte differentiation in human orbital fibroblasts in primary culture', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(9), pp. 3428–3431. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.81.9.8784110>.

Souchier, M. *et al.* (2013) '[Management of induced diplopia after orbital decompression: study of 87 interventions in 51 patients]', *Journal Francais D'ophtalmologie*, 36(2), pp. 103–111. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2012.06.011>.

Spallholz, J.E., Boylan, L.M. and Larsen, H.S. (1990) 'Advances in understanding selenium's role in the immune system', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 587, pp. 123–139. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb00140.x>.

Spinelli, C. *et al.* (2004) 'Surgical therapy of the thyroid papillary carcinoma in children: Experience with 56 patients ≤ 16 years old', *Journal of Pediatric Surgery*, 39(10), pp. 1500–1505. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2004.06.016>.

van Steensel, L. *et al.* (2012) 'PDGF enhances orbital fibroblast responses to TSHR stimulating autoantibodies in Graves' ophthalmopathy patients', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(6), pp. E944–953. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1020>.

Steiner, M.L.V. (2021) *Etablierung einer Zellkultur orbitaler Fibroblasten*. Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Available at: <https://doi.org/10.25358/OPENSOURCE-6120>.

Strieder, T.G.A. *et al.* (2003) 'Risk factors for and prevalence of thyroid disorders in a cross-sectional study among healthy female relatives of patients with autoimmune thyroid disease', *Clinical Endocrinology*, 59(3), pp. 396–401. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.2003.01862.x>.

Takahashi, Y. *et al.* (2014) 'Intraocular pressure change with eye positions before and after orbital decompression for thyroid eye disease', *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, 30(1), pp. 47–50. Available at: <https://doi.org/10.1097/IOP.0000000000000007>.

Tsui, S. *et al.* (2008) 'Evidence for an association between TSH and IGF-1 receptors', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(6), pp. 4397–4405.

Unal, M. *et al.* (2003) 'Balanced orbital decompression combined with fat removal in Graves ophthalmopathy: do we really need to remove the third wall?', *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, 19(2), pp. 112–118. Available at: <https://doi.org/10.1097/01.IOP.0000056145.71641.F5>.

Vaidya, B., Kendall-Taylor, P. and Pearce, S.H.S. (2002) 'The genetics of autoimmune thyroid disease', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(12), pp. 5385–5397. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020492>.

Valyasevi, R.W. *et al.* (1999) 'Differentiation of human orbital preadipocyte fibroblasts induces expression of functional thyrotropin receptor', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(7), pp. 2557–2562. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.84.7.5838>.

Venkatesh, R. and Sundaram, P.V. (1998) 'Modulation of stability properties of bovine trypsin after in vitro structural changes with a variety of chemical modifiers',

Protein Engineering Design and Selection, 11(8), pp. 691–698. Available at: <https://doi.org/10.1093/protein/11.8.691>.

Verity, D.H. and Rose, G.E. (2013) 'Acute thyroid eye disease (TED): principles of medical and surgical management', *Eye (London, England)*, 27(3), pp. 308–319. Available at: <https://doi.org/10.1038/eye.2012.284>.

Vestergaard, P. (2002) 'Smoking and thyroid disorders--a meta-analysis', *European Journal of Endocrinology*, 146(2), pp. 153–161. Available at: <https://doi.org/10.1530/eje.0.1460153>.

Wang, H.-S. *et al.* (1996) 'Leukoregulin Induction of Prostaglandin-Endoperoxide H Synthase-2 in Human Orbital Fibroblasts', *Journal of Biological Chemistry*, 271(37), pp. 22718–22728. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.37.22718>.

Wang, Y. *et al.* (2013) '[Modified orbital decompression for severe thyroid associated ophthalmopathy]', [*Zhonghua Yan Ke Za Zhi*] *Chinese Journal of Ophthalmology*, 49(3), pp. 242–249.

Wartofsky, L. (1997) 'Radioiodine therapy for Graves' disease: case selection and restrictions recommended to patients in North America', *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 7(2), pp. 213–216. Available at: <https://doi.org/10.1089/thy.1997.7.213>.

Weetman, A.P. *et al.* (1982) 'Thyroid antibodies are produced by thyroid-derived lymphocytes', *Clinical and Experimental Immunology*, 48(1), pp. 196–200.

Weetman, A.P. *et al.* (1984) 'Methimazole and generation of oxygen radicals by monocytes: potential role in immunosuppression', *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 288(6416), pp. 518–520. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmj.288.6416.518>.

Weetman, A.P. (1991) 'Thyroid-associated eye disease: pathophysiology', *The Lancet*, 338(8758), pp. 25–28. Available at: [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)90013-F](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)90013-F).

Weetman, A.P. (ed.) (2008) *Autoimmune diseases in endocrinology*. Totowa, N.J: Humana Press (Contemporary endocrinology).

Weissel, M. and Hauff, W. (2000) 'Fatal liver failure after high-dose glucocorticoid pulse therapy in a patient with severe thyroid eye disease', *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 10(6), p. 521. Available at: <https://doi.org/10.1089/thy.2000.10.521>.

Welkoborsky, H.-J. *et al.* (eds) (2016) *Orbita: interdisziplinäres Management der Orbitaerkrankungen*. 1. Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag.

Wiersinga, W.M. and Prummel, M.F. (2002) 'Graves' ophthalmopathy: a rational approach to treatment', *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 13(7), pp. 280–287. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(02\)00622-7](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(02)00622-7).

Wiersinga, W.M. and Wiersinga-Kahaly (eds) (2010) *Graves' orbitopathy: a multidisciplinary approach; questions and answers; 41 tables*. 2., rev. ed. Basel: Karger.

Winsa, B. *et al.* (1991) 'Stressful life events and Graves' disease', *Lancet (London, England)*, 338(8781), pp. 1475–1479. Available at: [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)92298-g](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)92298-g).

Yoshiuchi, K. *et al.* (1998) 'Stressful life events and smoking were associated with Graves' disease in women, but not in men', *Psychosomatic Medicine*, 60(2), pp. 182–185. Available at: <https://doi.org/10.1097/00006842-199803000-00013>.

van Zeijl, C.J.J. *et al.* (2010) 'Effects of thyrotropin and thyrotropin-receptor-stimulating Graves' disease immunoglobulin G on cyclic adenosine monophosphate and hyaluronan production in nondifferentiated orbital fibroblasts of Graves' ophthalmopathy patients', *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 20(5), pp. 535–544. Available at: <https://doi.org/10.1089/thy.2009.0447>.

van Zeijl, C.J.J. *et al.* (2011) 'Thyrotropin receptor-stimulating Graves' disease immunoglobulins induce hyaluronan synthesis by differentiated orbital fibroblasts

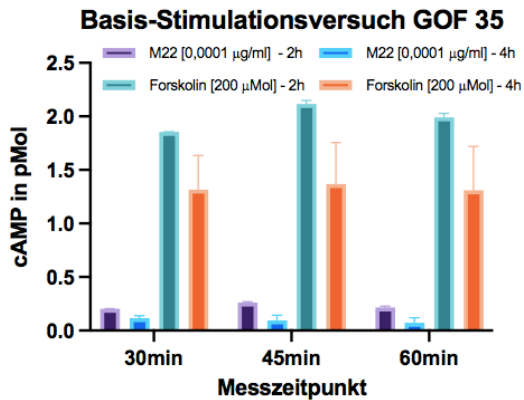
from patients with Graves' ophthalmopathy not only via cyclic adenosine monophosphate signaling pathways', *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 21(2), pp. 169–176. Available at: <https://doi.org/10.1089/thy.2010.0123>.

van Zeijl, C.J.J. *et al.* (2012) 'Complete inhibition of rhTSH-, Graves' disease IgG-, and M22-induced cAMP production in differentiated orbital fibroblasts by a low-molecular-weight TSHR antagonist', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(5), pp. E781-785. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2931>.

8. Anhang

8.1. Basisstimulationsversuch M22 und Forskolin

55a



55b

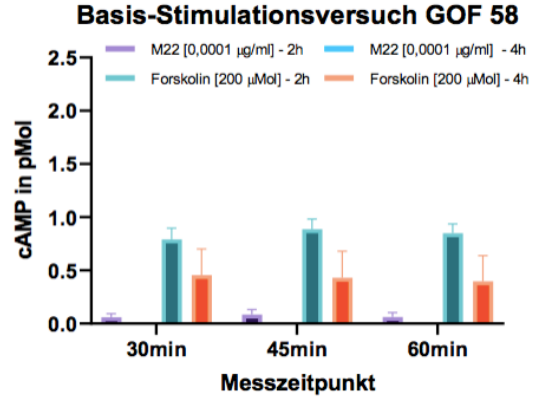
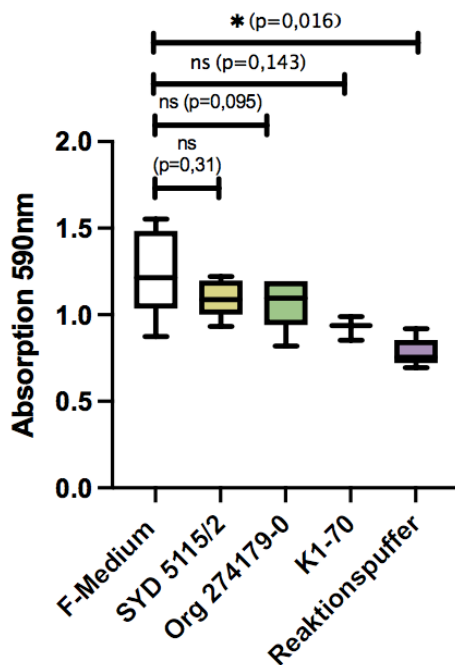


Abb. 55a und b: Basisstimulationsversuch von M22 und Forskolin in GOF Kultur 35 (a) und 58 (b).

8.2. Viabilität GOF Patient 35 (a) und 58 (b)

56a



56b

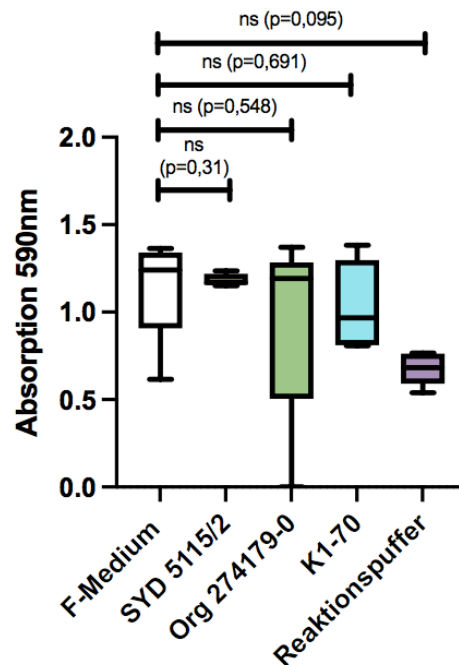
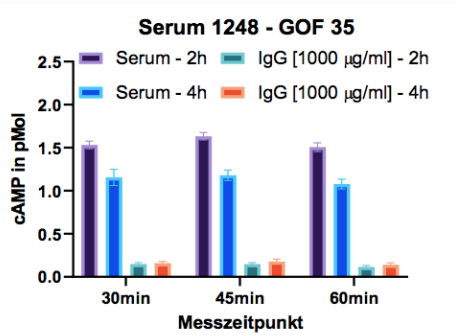


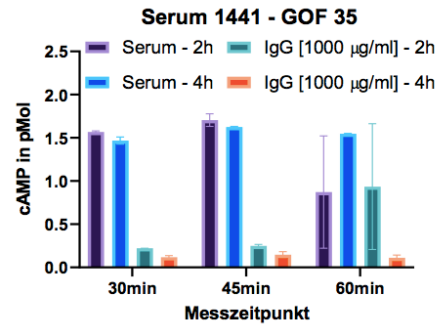
Abb. 56a und b: Viabilität GOF Patient 35 (a) und 58 (b).

8.3. Stimulationsversuche Serum-/IgG GOF Kultur 58

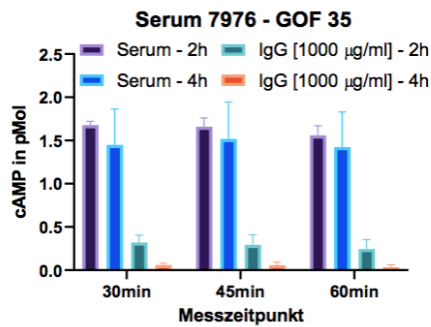
57a



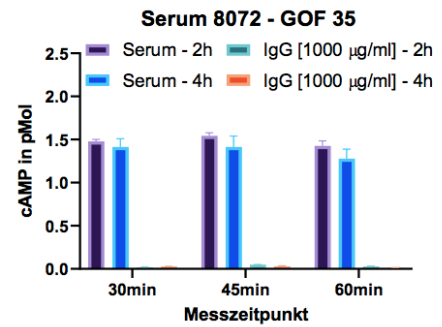
57b



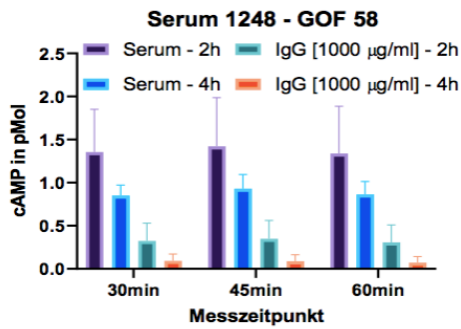
57c



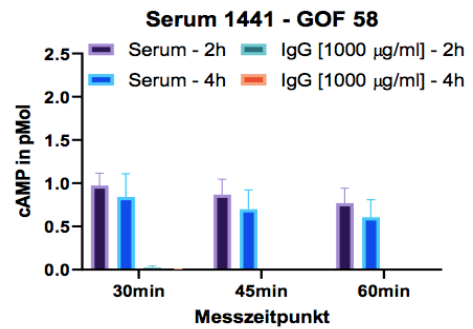
57d



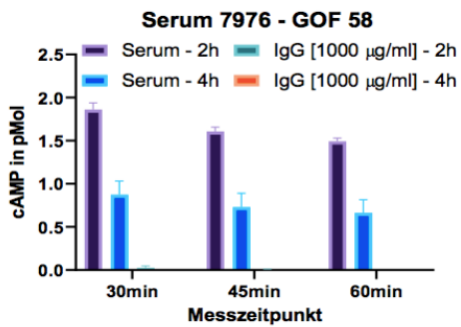
57e



57f



57g



57h

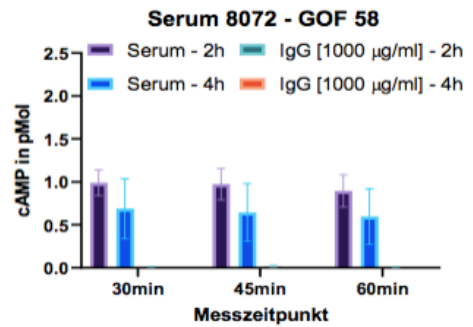


Abb. 57a-h: Detaillierte Darstellung Stimulationsversuche Serum-/IgG GOF Kultur 35 und 58.

8.4. Detaillierte Darstellung der Messzeiten

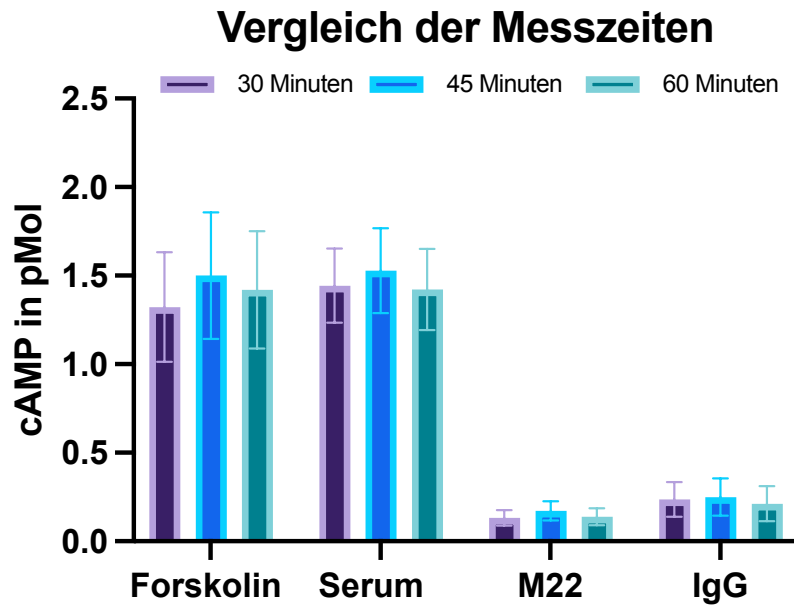


Abb. 58: Detaillierte Darstellung der verschiedenen Messzeitpunkte (30min, 45min und 60min). [c] Forskolin = 200 μ Mol, [c] M22 = 0,0001 μ g/ml, [c] IgG = 1000 μ g/ml

8.5. Verdünnungsreihe 18,18 ng/ml bis 0,0012 ng/ml des monoklonalen TSHR-Antikörpers M22

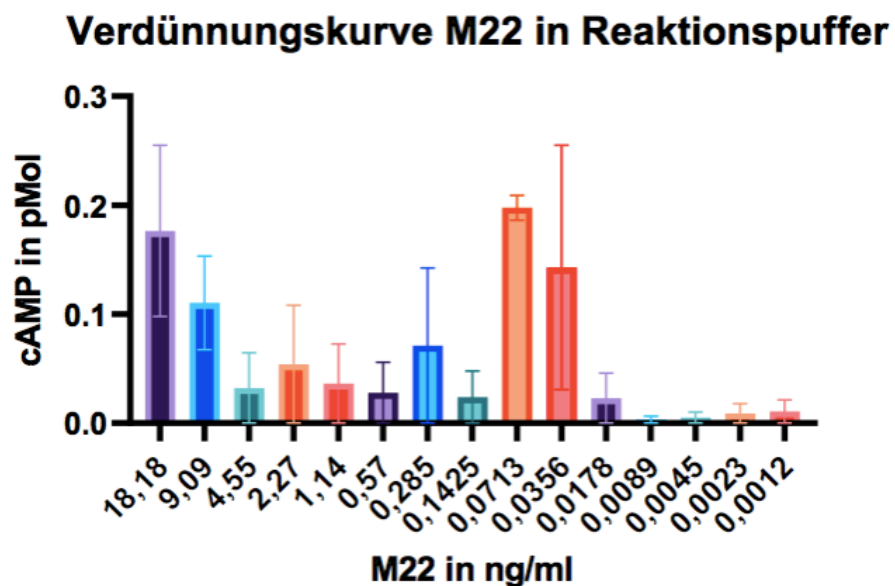


Abb. 59: Verdünnungsreihe 18,18 ng/ml bis 0,0012 ng/ml des monoklonalen TSHR-Antikörpers M22.

8.6. Effekte von verdünntem Serum

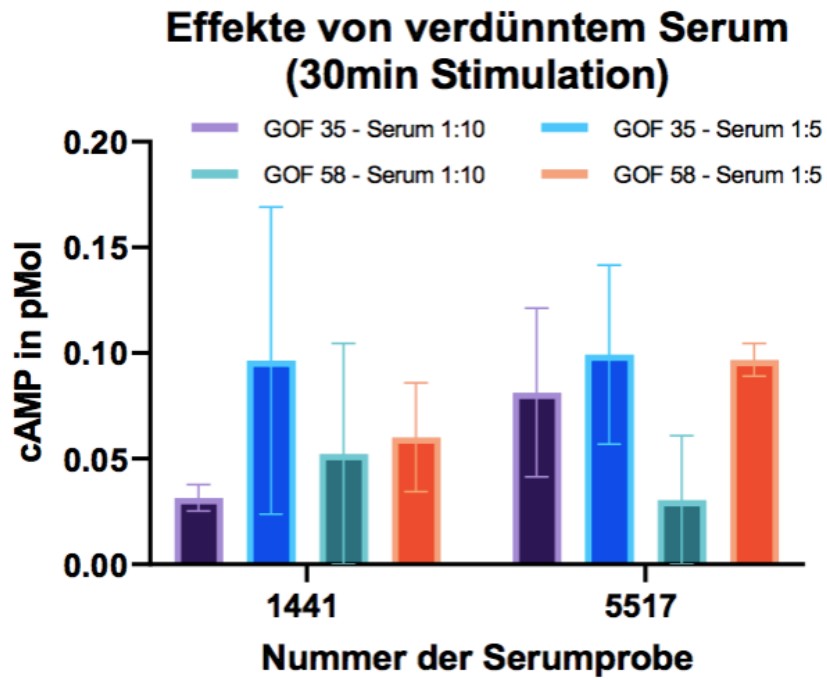


Abb. 60: Detaillierte Darstellung der Effekte von verdünntem Serum.

9. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird diese Seite in der digitalen Version nicht abgebildet.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird diese Seite in der digitalen Version nicht abgebildet.

10. Danksagung

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird diese Seite in der digitalen Version nicht abgebildet.